

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Le co-activateur TIF1 β dans la transcription
du gène de la pro-opiomélanocortine**

Par

Julien Desroches

Programme de Biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Août 2007

© Julien Desroches, 2007



Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Le co-activateur TIF1 β dans la transcription
du gène de la pro-opiomélanocortine

Présenté par :

Julien Desroches

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, Ph.D.

président-rapporteur

Jacques Drouin, D.Sc.

directeur de recherche

Sylvie Mader, Ph.D.

membre du jury

RÉSUMÉ

Chez les mammifères, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien régule l'homéostasie en réponse au stress. L'activateur primaire de cet axe est l'hormone hypothalamique CRH qui stimule la production de l'hormone pro-opiomélanocortine (POMC) par les cellules corticotropes de l'hypophyse. Cet effet de la CRH implique notamment une activation de la transcription du gène POMC qui est en grande partie médiée par les récepteurs nucléaires orphelins de famille Nur dont NGFI-B. En réponse aux signaux induits par la CRH, ces facteurs sont recrutés sous forme de dimères sur l'élément NurRE du promoteur POMC et ils recrutent eux-mêmes des co-activateurs pour ultimement activer la transcription.

La purification des protéines associées à NGFI-B a conduit à l'identification de TIF1 β . TIF1 β est un co-régulateur transcriptionnel préalablement caractérisé comme co-répresseur des facteurs de transcription à doigts de zinc contenant un domaine KRAB. Notre étude démontre que TIF1 β est un important co-activateur de NGFI-B impliqué dans la transcription du gène POMC. En effet, il active la transcription du gène POMC uniquement par l'intermédiaire de l'élément régulateur NurRE. De plus, il contribue de façon importante à l'activation transcriptionnelle induite par les signaux CRH en étant recruté au promoteur. Enfin, TIF1 β peut agir en synergie avec le co-activateur SRC-2 pour activer la transcription dépendante de NGFI-B. Ainsi, cette étude révèle une nouvelle fonction de TIF1 β dans l'activation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires orphelins de la famille Nur.

Mots-clés : transcription, NGFI-B, CRH, PKA, TIF1 β et SRC-2

SUMMARY

In mammals, the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis mediates the stress response and maintains homeostasis. The stimulation of pituitary corticotrophs by hypothalamic hormone CRH is the primary event that leads to an increased production of the pituitary proopiomelanocortin. The stimulatory signals elicited by CRH include activation of POMC transcription that is mediated in part by members of the orphan nuclear receptor Nur sub-family, including NGFI-B. CRH leads to formation of NGFI-B-containing dimers that bind to the POMC promoter NurRE sequence and to recruitment of coactivators for transcriptional activation.

In order to characterize the proteins and the mechanisms involved in CRH transcriptional activation of the POMC gene, we purified NGFI-B-associated proteins and thus identified TIF1 β . TIF1 β is a well-characterized transcriptional corepressor of the KRAB domain-containing zinc finger transcription factors. We report that TIF1 β is an important coactivator of NGFI-B activity for activation of POMC transcription. Indeed, TIF1 β enhances POMC transcription specifically through the NurRE regulatory element. Importantly, it is recruited to the POMC promoter and potentiates CRH activation of NGFI-B-dependent transcription. Furthermore, TIF1 β synergizes with another coactivator, SRC-2, to enhance NGFI-B-dependent transcription. This study reveals a new function for TIF1 β in transcriptional activation by orphan nuclear receptors.

Key words: transcription, NGFI-B, CRH, PKA, TIF1 β and SRC-2

TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury	II
Résumé	III
Summary	IV
Table des matières	V
Liste des Figures.....	X
Abréviations	XI
Remerciements	XVI
CHAPITRE 1. Introduction	2
1.1 L'hypophyse.....	3
1.1.1 Le lobe postérieur	4
1.1.2 Le lobe intermédiaire.....	5
1.1.3 Le lobe antérieur.....	5
1.1.3.1 Les lactotropes.....	5
1.1.3.2 Les somatotropes	6
1.1.3.3 Les thyrotropes	6
1.1.3.4 Les gonadotropes.....	6
1.1.3.5 Les corticotropes	7
1.2 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	7
1.2.1 Les neurones CRH du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus	8
1.2.2 Les corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse.....	8
1.2.3 Les glandes surrénales.....	9
1.2.3.1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes GR	10
1.2.3.2 Les effets des glucocorticoïdes.....	10
1.2.4 Les modèles murins d'études de l'axe	11
1.2.4.1 La souris CRH-/-	11
1.2.4.2 Les souris CRHR-/-	12
1.2.4.3 Les souris POMC-/-.....	12

1.2.4.4 La souris GR-/-	13
1.3 La pro-opiomélanocortine	14
1.3.1 La structure du gène POMC	15
1.3.2 La POMC et ses dérivés	16
1.3.3 Les récepteurs des mélanocortines	17
1.3.4 La POMC hypophysaire	17
1.3.5 La POMC hypothalamique et l'homéostasie énergétique	17
1.3.6 Rôles cutanés des produits de la POMC	18
1.4 Régulation transcriptionnelle basale et histo-spécifique du gène POMC ...	19
1.4.1 Le promoteur du gène POMC	19
1.4.2 Régulation de la transcription de base	19
1.4.3 Régulation histospécifique	20
1.4.3.1 Le facteur bHLH NeuroD1	21
1.4.3.2 Le facteur à homéodomaine Pitx1	22
1.4.3.3 Le facteur à boîte T Tpit	23
1.5 Régulation transcriptionnelle hormonale du gène POMC	24
1.5.1 Les récepteurs nucléaires	25
1.5.1.1 Structure générale	25
1.5.1.2 Mécanismes d'action généraux	26
1.5.2 Les co-régulateurs transcriptionnels	27
1.5.2.1 La famille SRC/p160	28
1.5.2.1.1 Rôles biologiques	28
1.5.2.1.2 Intégrateurs de signaux intracellulaires	29
1.5.3 Les récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille Nur	30
1.5.3.1 Patron d'expression	30
1.5.3.2 Propriétés de liaison à l'ADN	31
1.5.3.3. Domaines fonctionnels	31
1.5.3.4 Régulation des facteurs par phosphorylation	32
1.5.3.5 Rôles physiologiques	32
1.5.3.5.1 Implication dans la stéroïdogénèse	32

1.5.3.5.2 Des régulateurs de l'axe HPA <i>in vivo</i> ?.....	33
1.5.3.5.3 Implication dans l'apoptose.....	33
1.5.3.5.4 Autres fonctions biologiques.....	34
1.5.4 Activation transcriptionnelle du gène POMC par la CRH.....	34
1.5.4.1 Voies de signalisation.....	35
1.5.4.2 Identification des séquences régulatrices et des facteurs de transcription.....	35
1.5.4.3 Mécanismes d'activation par les facteurs Nur	36
1.5.4.4 Activation par le facteur Tpit	37
1.5.5 Répression transcriptionnelle du gène POMC par les glucocorticoïdes ...	38
1.6 La famille de co-régulateurs TIF1	39
1.6.1 TIF1 α	40
1.6.2 Bonus.....	42
1.6.3 TIF1 β	42
1.6.4 TIF1 γ	43
1.6.5 TIF1 δ	44
1.7 Objectifs de travail	45
1.8 Contribution et accord des coauteurs.....	46
 CHAPITRE 2 : TIF1 β /KAP-1 is a novel coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77 and participates in Nur-dependent hormone responsiveness.....	49
2.1 Abstract	50
2.2 Introduction	51
2.3 Results.....	54
2.3.1 Several transcriptional regulatory proteins interact with NGFI-B	54
2.3.2 TIF1 β is a coactivator of NGFI-B and enhances POMC gene transcription	

.....	55
2.3.3 TIF1 β potentiates both CRH and PKA signaling through the NurRE but not the Tpit/PitxRE and it is recruited to the POMC promoter.....	56
2.3.4 Within the Nur family, NGFI-B is the preferred target of TIF1 β	57
2.3.5 TIF1 β synergizes with the coactivator SRC-2 for Nur-dependent transcription.....	57
2.4 Discussion	58
2.4.1 Coactivator synergism.....	58
2.4.2 TIF1 β as coactivator.....	59
2.5 Materials and Methods	61
2.5.1 Plasmids.....	61
2.5.2 Cell culture and transfection	62
2.5.3 Generation of retrovirus-infected AtT-20 cells	62
2.5.4 Nuclear extract preparation and Flag purification procedure.....	62
2.5.5 Mass spectrometry analysis.....	63
2.5.6 Coimmunoprecipitation assays and Western blot analysis	63
2.5.7 Superose 6 gel filtration	64
2.5.8 Chromatin immunoprecipitation and QPCR.....	65
2.5.9 siRNA and RT-QPCR	65
2.6 Acknowledgments.....	66
2.7 References	67
2.8 Figure legends.....	76
2.9 Figures	79
CHAPITRE 3: Discussion et perspectives	86
3.1 Co-régulateurs potentiels de NGFI-B.....	87

3.2 Mécanismes d'action de TIF1β	89
3.2.1 Synergie entre TIF1 β et SRC-2.....	89
3.2.2 Régulation de la transcription du gène POMC par TIF1 β	91
3.2.3 Activation de la transcription via les facteurs Nur.....	94
3.3 Rôle de TIF1β <i>in vivo</i>	95
3.4 TIF1β vs TIF1α	96
3.5 TIF1β comme intégrateur de signaux.....	97
3.6 Conclusion.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	100

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1. Introduction

Figure 1.1 Représentation schématique de l'hypophyse et de ses principaux composants chez l'humain	4
Figure 1.2 Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien	9
Figure 1.3 Clivage de la POMC dans l'hypophyse et l'hypothalamus	16
Figure 1.4 Représentation schématique du promoteur du gène POMC et des facteurs contribuant à la transcription basale et histospécifique.....	20
Figure 1.5 Structure générale des récepteurs nucléaires et des membres de la sous-famille NGFI-B	25
Figure 1.6 Régulation hormonale de la transcription du gène POMC au sein de l'axe HPA.....	38
Figure 1.7 Structure des membres de la famille TIF1	40

CHAPITRE 2 : TIF1 β /KAP-1 is a novel coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B and participates in Nur-dependent hormone responsiveness

Figure 1 The orphan nuclear receptors NGFI-B and Nurr1 are part of high molecular weight protein complexes.....	79
Figure 2 Proteins associated with NGFI-B in AtT-20 nuclear extracts	80
Figure 3 TIF1 β enhances POMC gene transcription and NGFI-B-dependent transcription.....	81
Figure 4 TIF1 β enhances CRH and PKA responses	82
Figure 5 NGFI-B is a preferred target of TIF1 β	83
Figure 6 Synergistic activation of TIF1 β and SRC-2 of NGFI-B-dependent transcription.....	84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
ACTH	Adrénocorticotropine
AD1	Activation domain 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF	« Activation function »
AhR	Récepteur de l'aryl hydrocarbone
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
API/2	« Activator protein 1/2 »
AR	Récepteur aux androgènes
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASC-2	« Activating signal cointegrator-2 »
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Vasopressine
BAF	« Brg-1/Brm-associated factor »
BH3	« Bcl-2 homology »
bHLH	Domaine basique-hélice-boucle-hélice
bp	Paire de base
BRET	« Bioluminescence resonance energy transfer »
Brg-1	Brahma-related gene 1
C	Cytosine
C-	Carboxy
CAMKII	« Calmodulin-dependent protein kinase II »
CARM-1	« Co-activator-associated arginine methyltransferase-1 »
CBP	« cAMP-response element binding protein »
CE	Élément central
c/EBPβ	« CCAAT-enhancer binding protein β »
ChD	Chromodomaine

ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CLIP	« Corticotropin-like intermediate lobe protein »
COUP-TF	« Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor »
Cre	Cre recombinase
CRH	« Corticotropin releasing hormone »
CRH-BP	Peptide de liaison à la CRH
CRH-R	Récepteur à la CRH
CUTE	« Corticotroph upstream transcription element-binding »
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DE	Élément distal
Dex	Dexaméthasone
DMEM	« Dulbecco's modified eagle medium »
DR	Répétition directe
DRIP	« vitamin D receptor-interacting protein »
DTT	Dithiothréitol
e	Jour embryonnaire
EF-1	Facteur d'élongation 1
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
EGFP	« enhanced green fluorescent protein »
end	Endorphine
ER	Récepteur aux oestrogènes
ERK (p44/p42)	« Extracellular signal-regulated kinase »
FBS	Sérum de bovin fétal
FSH	Follitropine ou « follicle-stimulating hormone »
G	Guanine
Gc	Glucocorticoïdes
GH	Hormone de croissance ou « growth hormone »
GHRH	« Growth hormone releasing hormone »
GnRH	« Gonadotropin-releasing hormone »

GnRHR	« Gonadotropin-releasing hormone receptor »
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GSU	Sous-unité glycoprotéique
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone déacétylase
HEK	« Human embryonic kidney »
HP1	Hétérochromatine protéine 1
HPA	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HRE	élément de réponse hormonale
HRP	« Horseradish peroxidase »
Hsp	« Heat shock protein »
IgG	Immunoglobuline G
JP	« Joining peptide »
KAP-1	« KRAB-associated protein 1 »
kb	Kilopaire de bases
kDa	Kilodalton
KRAB	« Kruppel-associated box »
KRIP-1	« KRAB-interactingprotein 1 »
LBD	Domaine de liaison au ligand
LH	Lutropine ou « luteinizing hormone »
LPH	Hormone lipotropine
Lys	Lysine
MALDI-TOF	« Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight »
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
MCR	« Melanocortin receptor »
Mda	Mégadalton

MEK	MAP kinase/Erk kinase kinase
mg	Milligramme
MR	Récepteur aux minéralocorticoïdes
MSH	« melanocyte-stimulating hormone »
MTA	« Metastasis-associated protein »
Mybbp1a	« Myb binding protein 1a »
MW	Poids moléculaire
N-	Amino
NBRE	Monomère de l'élément de réponse aux facteurs Nur
NE	Extraits nucléaires
NeuroD1	« Neurogenic differentiation factor 1 »
NGF	« Nerve growth factor »
NGFI-B (Nur77)	« Nerve growth factor inducible-clone B »
nGRE	Élément négatif de réponse aux glucocorticoïdes
NOR-1	« Neuron-derived orphan receptor 1 »
NP-40	Nonidet P-40
NR	Récepteur nucléaire
nt	Nucléotide
NuRD	« Nucleosome remodeling and histone deacetylase »
Nurr1	« Nur-related factor 1 »
NurRE	Dimère de l'élément de réponse aux facteurs Nur
OT	Ocytocine
P	Proline
Pan1/2	« Pancreas protein 1/2 »
Pb	Paire de base
PBS	Tampon salin phosphate
PC	Prohormone convertase
p/CAF	« p300/CBP associated protein »
PCR	« Polymerase chain reaction »
PCRH-REB1	« Proopiomelanocortin corticotropin-releasing hormone responsive

	element binding protein 1 »
PAGE	Électrophorèse sur gel polyacrylamide
PE	Élément proximal
Pelp1	« Proline, glutamic acid and leucine rich protein 1 »
pH	« Power of hydrogen »
PHD	« Plant homeodomain »
Pitx1	« Pituitary homeobox 1 »
Pit-1	« Pituitary-specific positive transcription factor 1 »
PKA	Protéine kinase A
PML	« Promyelocytic leukemia protein »
PMSF	Phénylméthylsulphonyl fluoride
POMC	Pro-opiomélanocortine
PP1	« Putative pituitary POMC 1 »
PR	Récepteur de la progestérone
pRB	Protéine de rétinoblastome
PRL	Prolactine
PRMT1	Protéine arginine méthyltransférase prédominante type 1
RA	Acide rétinoïque
Rap1	« Repressor activator protein 1 »
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
Rb	Rétinoblastome
RE	Élément de réponse
RING	« Really interesting new gene »
rpm	Rotation par minute
RSV	« Rous sarcoma virus »
RXR	Récepteurs de l'acide X rétinoïque (forme 9- <i>cis</i>)
S (Ser)	Sérine
SDS	Sodium dodécyl sulphate
SETDB1	« SET domain, bifurcated 1 »
SF-1	« Steroidogenic factor 1 »

siRNA	« small interfering RNA »
Sp1	« Specific protein 1 »
SRC	« Steroid receptor coactivator »
STAT	« Signal transducer and activator of transcription »
SUMO	« Small ubiquitin-related modifier »
SWI/SNF	« Switching and/or sucrose non fermenting »
T	Thymine
T (Thr)	Thréonine
Tbx	« T-box factor »
TAF	« TBP associated factor »
TF	Facteur de transcription
TIF1	« Transcriptional intermediary factor 1 »
TIF2	« Transcriptional intermediary factor 2 »
TMOD	Tropomoduline
Topo	Topoisomérase
Tpit	« Pituitary T-box »
Tpit/PitxRE	Élément de réponse à Tpit et Pitx1
TR	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
TRAP	Protéines associées au récepteur aux hormones thyroïdiennes
TRE	Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH	« Thyrotropin-releasing hormone »
TSH	Thyréotropine ou « thyroid-stimulating hormone »
V	Valine
VDR	Récepteur à la vitamine D
WCE	Extraits cellulaires protéiques totaux
ZFP	Protéine à doigts de zinc

REMERCIEMENTS

Je désire remercier tout d'abord tous les membres de ma famille, particulièrement mes parents Claudette et Michel, qui m'ont encouragé et supporté moralement et financièrement. Leur présence et leur confiance furent très appréciées. C'est avec beaucoup d'affection que je remercie ma compagne Katherine pour m'avoir apporté son soutien, sa confiance et son amour tout au long de mes études.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, Jacques Drouin. J'ai grandement apprécié qu'il partage avec moi sa culture scientifique, sa passion pour la recherche et qu'il m'offre de précieux conseils pendant mes études. Sa générosité, sa disponibilité et son écoute m'ont énormément apporté.

J'aimerais remercier tout particulièrement mon superviseur Aurélio Balsalobre pour avoir toujours su me consacrer du temps et pour tout le soutien qu'il m'a offert depuis mon entrée au laboratoire. Sa disponibilité et sa gentillesse m'ont accompagné tout au long de mes études. Je salue et remercie tous mes collègues du laboratoire pour leur aide et pour tous les moments de divertissement, particulièrement Olivier Kirsh et Jean-François Ouimette avec qui j'ai partagé plusieurs excellents et distrayants moments. Je remercie David Langlais non seulement pour ses généreux conseils mais aussi pour m'avoir aidé à gratter quelques mètres carrés de cellules.

C'est avec reconnaissance que je remercie Muriel Aubry et Sylvie Mader pour avoir accepté sans hésitation d'être les membres du jury pour l'évaluation de mon mémoire de maîtrise.

Je remercie les IRSC pour leur soutien financier.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. Introduction

Chez les mammifères, la réponse au stress est contrôlée par une composante nerveuse, permettant une réponse immédiate, et une composante endocrine dont la réponse se propage plus lentement. Il s'agit du système nerveux sympathique médullosurrénalien et du système hypothalamo-hypophysio-surrénalien, respectivement. Ces deux systèmes fonctionnent de concert pour créer un équilibre homéostatique chez l'organisme en influençant de nombreuses fonctions biologiques telles que les systèmes immunitaire, reproductif et digestif de même que le cœur et le cerveau.

Le système nerveux sympathique médullosurrénalien se réfère à la réponse de type « fight or flight » qui prépare le corps à réagir rapidement face à un obstacle. Lorsque ce système est activé, le cerveau envoie un message par la moëlle épinière qui active la sécrétion d'épinéphrine et de norépinéphrine par la médullosurrénale. Ces messagers agissent rapidement sur la physiologie du corps pour permettre une réponse immédiate devant un danger.

L'axe HPA est davantage impliqué dans la réponse au stress à moyen terme. Un des objectifs de cet axe est d'augmenter la disponibilité de l'énergie utilisable par le corps. Lorsque le cerveau détecte un stress, l'axe est activé et finement régulé. Il y a trois éléments clés qui composent l'axe HPA et la communication entre ces éléments est une composante essentielle de la réponse neuroendocrine au stress. Le premier élément est le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus qui contient des neurones neuroendocriniens et qui sécrète des peptides, la CRH et la vasopressine. Ces peptides ont pour fonction de réguler le second élément, les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, en stimulant la sécrétion de l'adrénocorticotropine. Cette hormone agit ensuite sur le dernier composant, les glandes surrénales, pour induire la sécrétion de glucocorticoïdes, l'effecteur du contrôle de la réponse au stress. Les glucocorticoïdes ont de nombreux effets physiologiques dont un effet important sur le métabolisme. Ils favorisent la production d'éléments énergétiques à partir des nutriments emmagasinés, soient les triglycérides, le glycogène et les protéines, qui serviront à nourrir le cerveau et les autres organes essentiels. Ce même effecteur module la réponse au stress par rétro-contrôle négatif sur l'hypothalamus et sur l'hypophyse, fermant ainsi la boucle de régulation.

Mes travaux de recherche présentés dans ce mémoire s'intègrent dans la biologie de l'axe HPA, plus particulièrement sur l'étude des mécanismes de la transcription du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) dans les cellules corticotropes, un élément important de l'axe. Ainsi, le texte qui suit traite en détails des composants de l'axe HPA et des mécanismes moléculaires qui le régulent.

1.1 L'hypophyse

L'hypophyse est la glande endocrine maîtresse qui intègre plusieurs axes endocriniens. Elle répond aux signaux provenant de l'hypothalamus et coordonne le maintien de l'homéostasie chez les vertébrés. L'hypophyse sécrète six hormones essentielles qui régulent le métabolisme, la croissance, le développement et la fonction de la glande thyroïde, des glandes surrénales, des gonades et des glandes mammaires. Un désordre dans la fonction de la glande hypophysaire peut entraîner une hyperstimulation d'un organe cible donné ou une déficience qui peuvent engendrer un état pathologique grave.

La glande hypophyse se situe à la base du cerveau et se trouve dans une cavité osseuse appelée selle turcique. Le poids moyen d'une hypophyse est de 0.6 g chez l'homme et varie évidemment en fonction de l'âge. L'augmentation la plus évidente se produit chez la femelle pendant la phase de gestation et de lactation. L'hypophyse est approvisionnée en sang par les artères hypophysaires antérieure et postérieure qui dérivent des carotides. L'artère antérieure hypophysaire approvisionne la neurohypophyse en sang. L'artère supérieure pénètre l'infundibulum et se termine par un réseau de capillaires dans lesquels les hormones hypothalamiques seront déversées. Ces capillaires se distinguent des autres capillaires du cerveau par le fait qu'ils sont comparables à ceux des glandes endocrines afin de permettre la diffusion et la sécrétion de molécules dans la circulation sanguine. Les veines parallèles dérivant de ces capillaires sont les veines portes. Elles se prolongent le long de la tige hypophysaire et se terminent dans les capillaires adénohypophysaires qui transportent de hautes concentrations d'hormones hypothalamiques (Figure 1.1, page 4).

La glande hypophyse se divise en deux parties, chacune d'elle dérivant de deux

sources distinctes. Il y a d'une part la partie épithéliale, constituée du pars distalis, du pars intermedia et du pars tuberalis, qui dérive de l'invagination de l'ectoderme oral appelé poche de Rathke et qui formera l'adénohypophyse. D'autre part, il y a la partie neurale qui se développe embryologiquement à partir du diencephale ventral. Elle inclut l'infundibulum, la tige hypophysaire et le pars nervosa, que l'on appellera la neurohypophyse ou lobe postérieur.

Les neurones de l'hypothalamus sécrètent la vasopressine et l'ocytocine qui sont relâchés au niveau du lobe postérieur. Ces neurones sécrètent aussi des hormones qui régulent la synthèse et la relâche des hormones du lobe antérieur.

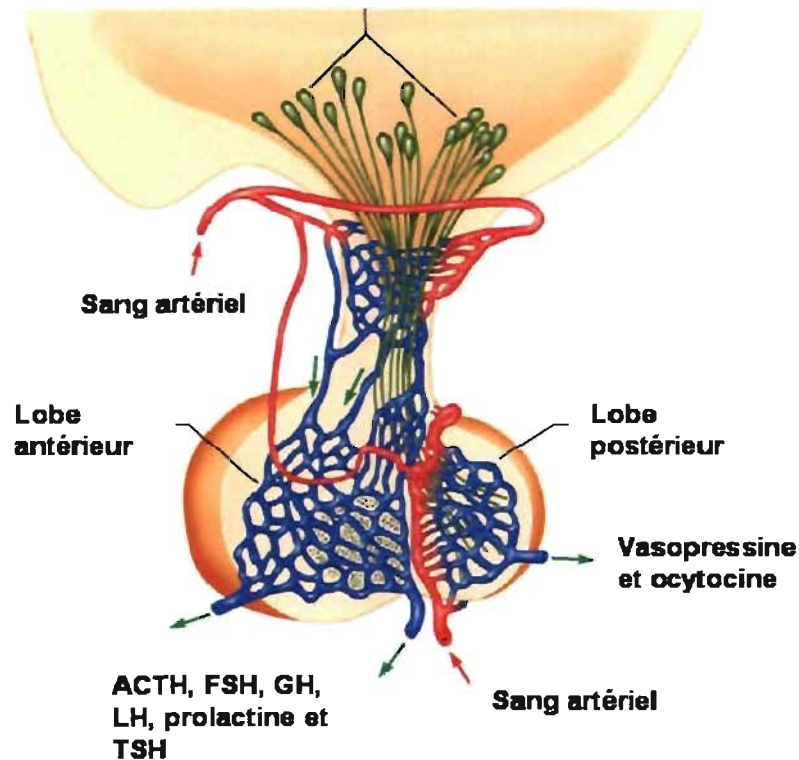


Figure 1.1 : Représentation schématique de l'hypophyse et de ses principaux composants chez l'humain. Un réseau de capillaires sanguins parcourt les lobes antérieur et postérieur d'une hypophyse adulte à l'intérieur duquel sont sécrétées les différentes hormones hypophysaires. Adapté de (Mednote, 2007).

1.1.1 Le lobe postérieur

Le lobe postérieur représente la prolongation descendante du système nerveux central et est composé des terminaisons axonales de neurones dont les corps cellulaires se trouvent dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaire de l'hypothalamus. Ces neurones neurosécréteurs sécrètent deux hormones hypothalamiques, la vasopressine

(AVP) et l'ocytocine (OT). La neurohypophyse est également composée de cellules gliales appelées « pituicytes ». Lorsque la glande est active, ces cellules qui entourent les terminaisons nerveuses se rétractent pour ainsi exposer ces terminaisons et permettre la sécrétion de vasopressine ou d'ocytocine (Theodosis *et al.*, 2006). La fonction biologique de l'AVP est de réguler la rétention d'eau par les reins en agissant à titre d'antidiurétique. L'OT agit sur l'utérus en stimulant les contractions utérines pendant l'accouchement et agit sur les glandes mammaires en favorisant l'éjection du lait des alvéoles mammaires lors de l'allaitement.

1.1.2 Le lobe intermédiaire

Le lobe intermédiaire ou pars intermedia se retrouve entre le pars distalis et le lobe postérieur. Il dérive embryologiquement de la portion postérieure de la poche de Rathke. Il est développé chez la plupart des vertébrés et particulièrement chez les rongeurs. Chez l'humain, le lobe intermédiaire se développe chez le fœtus au cours de l'embryogenèse mais s'atrophie après la naissance pour disparaître chez l'adulte. Le lobe intermédiaire se compose uniquement de cellules mélanotropes qui sécrètent les mélanocortines α -, β - et γ -MSH. La section 1.3.6 décrit les fonctions biologiques des mélanocortines.

1.1.3 Le lobe antérieur

Le lobe antérieur est subdivisé en deux régions, le pars tuberalis et le pars distalis. Le pars tuberalis représente la prolongation ascendante du lobe antérieur. Le pars distalis est la plus grande division du lobe antérieure qui contient cinq lignées cellulaires sécrétant six hormones (Ooi *et al.*, 2004): les lactotropes qui produisent la prolactine ou PRL, les somatotropes qui sécrètent l'hormone de croissance ou GH, les thyrotropes qui sécrète la thyrotropine ou TSH, les gonadotropes qui sécrètent la lutropine ou LH et la follitropine ou FSH et les corticotropes qui sécrètent l'adrénocorticotropine ou ACTH. Le lobe antérieur de l'hypophyse représente 80 % de la glande.

1.1.3.1 Les lactotropes

Ces cellules sécrètent la PRL et présentent un patron de distribution étalé dans le pars distalis, comptant pour 10 à 30 % de la population cellulaire. La prolactine stimule la croissance des glandes mammaires et permet aussi d'initier et de maintenir la lactation. La sécrétion de PRL est inhibée par la dopamine et stimulée par plusieurs facteurs dont la TRH

et les oestrogènes (Samson *et al.*, 2003). La tétée du nourrisson stimule également les niveaux de prolactine (Voogt, 1978). Enfin, la prolactine agit sur l'hypothalamus pour influencer la sécrétion des gonadotropines via la régulation des niveaux de dopamine.

1.1.3.2 Les somatotropes

Les somatotropes qui sécrètent l'hormone de croissance GH représente 50 % des cellules du lobe antérieur de l'hypophyse. La sécrétion de GH est régulée positivement par l'hormone GHRH et négativement par la somatostatine (Muller *et al.*, 1999). Les plus hauts niveaux de sécrétion de GH surviennent pendant l'adolescence et diminuent avec l'âge. La GH est l'une des hormones anaboliques les plus importantes de l'organisme en favorisant la synthèse protéique et l'augmentation de masse musculaire ainsi que la lipolyse et la diminution de masse adipeuse (Cohick and Clemmons, 1993). Elle agit sur plusieurs tissus et organes cibles où elle stimule la prolifération et différenciation cellulaire et elle est responsable de la croissance staturale.

1.1.3.3 Les thyrotropes

Les thyrotropes compte pour 5 % des cellules du lobe antérieur de l'hypophyse et produisent la TSH, qui est une glycoprotéine au même titre que les gonadotropines LH et FSH. Chacune de ces hormones est composée de deux sous-unités liées de façon non covalente, α et β , où la sous-unité α est commune aux trois hormones et la sous-unité β est unique et confère la spécificité biologique. La sécrétion de la thyrotropine est régulée positivement par l'hormone hypothalamique TRH (Persani, 1998) et négativement par les hormones thyroïdiennes, thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3). T3 et T4 agissent par rétroaction négative sur l'hypothalamus pour réprimer la synthèse de la TRH et au niveau de l'hypophyse pour inhiber la sécrétion de la TSH. La TSH stimule la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes qui sont essentielles pour le développement et la différenciation de nombreuses cellules de l'organisme ainsi que pour réguler le métabolisme basal.

1.1.3.4 Les gonadotropes

Les gonadotropes comptent pour 20 % de la glande hypophyse humaine et produisent la LH et la FSH. La production des gonadotropines est stimulée par la GnRH hypothalamique (Pawson and McNeilly, 2005) et ces hormones agissent sur les testicules et

les ovaires. La LH régule la production des hormones stéroïdiennes, la testostérone produite chez le mâle par les cellules de Leydig et chez la femelle, la LH est responsable de la sécrétion de progestérone et d'oestrogènes par le corps jaune. Une montée subite de la LH induit la rupture du follicule lors de l'ovulation et permet le développement du corps jaune. Pour sa part, la FSH favorise la spermatogenèse en stimulant les cellules de Sertoli chez le mâle et est critique pour le processus d'ovulation et le développement du follicule ovarien chez la femelle. Ces hormones stéroïdes exercent une rétroaction négative hypothalamique et hypophysaire.

1.1.3.5 Les corticotropes

Les corticotropes sont au centre de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Cette population cellulaire représente 10 % des cellules du lobe antérieur de l'hypophyse et sécrète l'ACTH qui est produite par clivage protéolytique du précurseur peptidique POMC à partir de e12.5 chez la souris. L'ACTH stimule la synthèse et la sécrétion de cortisol (chez les humains) ou de corticostérone (chez les rongeurs) par les glandes surrénales, ce qui permet le maintien de l'homéostasie et contribue à la réponse au stress. La sécrétion d'ACTH est régulée par l'hormone de relâche de la corticotropine, CRH, qui provient du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Également, la vasopressine a peu d'effet sur la relâche de corticotropine mais agit en synergie avec la CRH (Bilezikjian *et al.*, 1987). En revanche, les glucocorticoïdes inhibent la sécrétion de corticotropine en exerçant un rétro-contrôle négatif au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

1.2 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Le stress est un mécanisme physiologique complexe qui regroupe une panoplie de processus physiologiques et comportementaux qui ont lieu en présence d'une perturbation perceptible ou réelle de l'homéostasie. Ces processus ont pour objectif de faire face à ces perturbations tout en rétablissant l'homéostasie. Cependant, une activation excessive et inadéquate des systèmes de stress dans un organisme peut perturber les fonctions physiologiques et comportementales, résultant en des conséquences graves telles que la dépression, des maladies cardiovasculaires, des fonctions immunitaires altérées avec une sensibilité accrue à la maladie, et bien d'autres (Chrousos and Gold, 1992; Charmandari *et al.*, 2005). L'étude des mécanismes neuroendocriniens fondamentaux qui sont à la base des

réponses physiologiques au stress généreront des connaissances qui pourront être utilisées pour générer des traitements pour les personnes à risque de la maladie.

1.2.1 Les neurones CRH du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

Les stimuli intrinsèques ou extrinsèques qui affectent l'homéostasie activent plusieurs systèmes physiologiques dont l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (axe HPA), qui est particulièrement étudié. Les signaux qui proviennent du système nerveux central ou périphérique sont confiés aux centres de l'hypothalamus. Une cascade d'événements est ensuite initiée. L'activation de l'axe HPA résulte en : 1) la stimulation des neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et 2) la relâche de neuropeptides CRH et AVP dans le système sanguin porte hypothalamo-hypophysaire via la projection des axones dans l'éminence médiane, pour atteindre l'adénohypophyse où se trouvent les corticotropes. La CRH est un des facteurs clefs dans ce processus. Il s'agit d'un peptide de 41 acides aminés qui intègre la communication entre les systèmes nerveux, immunitaire et endocrinien (Vale *et al.*, 1981).

1.2.2 Les corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse

L'action de la CRH seule ou combinée avec l'AVP (Gillies *et al.*, 1982) sur les corticotropes stimule la sécrétion de l'ACTH, un dérivé du précurseur peptidique POMC (voir section 1.3.2), dans la circulation systémique en quelques secondes. La transcription du gène POMC ainsi que sa biosynthèse sont aussi augmentées (Watanabe and Orth, 1987;Lundblad and Roberts, 1988). Le récepteur de la CRH, CRHR-1, est un récepteur couplé aux protéines G à sept passages transmembranaires. Cette interaction induit une activation de l'adénylate cyclase ainsi qu'une cascade de signalisation qui inclut une production d'un second messenger intracellulaire, l'AMP cyclique (AMPc). Le ligand continue d'activer son récepteur jusqu'à ce qu'il soit détruit ou retiré du système par la CRH-BP (Behan *et al.*, 1989). L'ACTH circulante agit sur la zone fasciculaire de la corticosurrénale via son récepteur membranaire pour stimuler la synthèse des glucocorticoïdes, qui constituent l'effecteur final de l'axe HPA (Figure 1.2, page 9). Par rétroaction négative, les glucocorticoïdes régulent la sécrétion et la synthèse des hormones hypothalamiques CRH et AVP ainsi que de l'ACTH hypophysaire (Birnberg *et al.*, 1983;Canny *et al.*, 1989). Cette rétroaction négative des glucocorticoïdes est essentielle pour limiter l'exposition des tissus aux glucocorticoïdes et pour minimiser leurs effets

cataboliques, lipogéniques, antireproductifs et immunosuppresseifs. Une production dérégulée de glucocorticoïdes par l'axe HPA entraîne une pathologie clinique. Par exemple, une production autonome non régulée d'ACTH avec une production excessive de glucocorticoïdes tel qu'on l'observe chez les patients atteints de la maladie de Cushing entraîne l'obésité, une hyperglycémie, l'hypertension et l'ostéoporose.

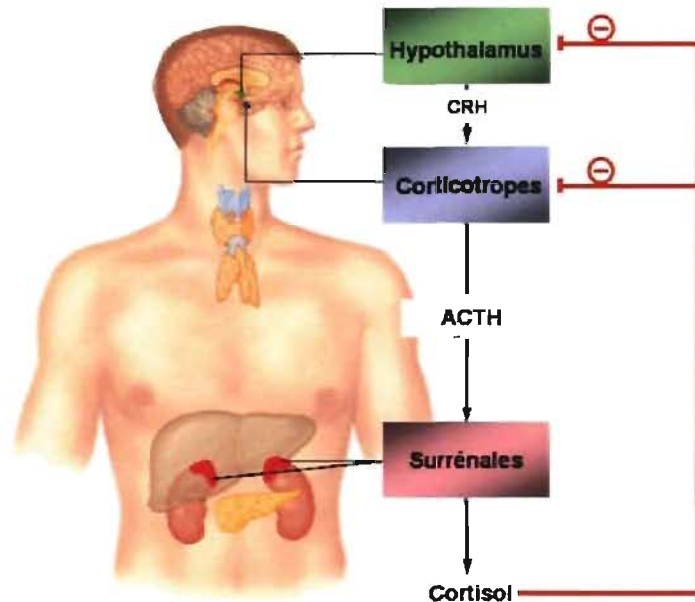


Figure 1.2 : Axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. L'hormone hypothalamique CRH stimule la sécrétion d'ACTH hypophysaire par les corticotropes dans la circulation sanguine. L'ACTH ainsi libérée agit sur les corticosurrénales pour induire la sécrétion des glucocorticoïdes. Par rétroaction négative au niveau de l'hypothalamus et des corticotropes, les glucocorticoïdes régulent la production d'ACTH. Adapté de (Vitalife Networks, 2007).

1.2.3 Les glandes surrénales

Les glandes surrénales sont deux petites glandes situées au-dessus des reins qui se composent de deux parties : une partie centrale appelée médullosurrénale et une partie périphérique appelée corticosurrénale. La médullosurrénale est un tissu homogène alors que la corticosurrénale se subdivise en trois zones cellulaires, allant de la périphérie vers la profondeur: la zone glomérulaire qui produit les minéralocorticoïdes dont l'aldostérone est le type majoritaire; la zone fasciculaire qui produit les glucocorticoïdes; la zone réticulaire qui produit des stéroïdes à action androgène et des oestrogènes. Enfin, la médullosurrénale est composée des cellules chromaffines qui produisent les catécholamines.

1.2.3.1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes GR

Les glucocorticoïdes exercent leurs effets via leurs récepteurs intracellulaires exprimés dans la plupart des tissus. Les glucocorticoïdes sont des molécules liposolubles qui entrent dans le cerveau par la barrière hémato-encéphalique. Il existe deux types de récepteurs dans le cerveau et l'hypophyse : le type I qui est le récepteur aux minéralocorticoïdes ou MR qui lie l'aldostérone et les glucocorticoïdes avec une haute affinité et le type II, le récepteur aux glucocorticoïdes ou GR (Grossman *et al.*, 2003). Les récepteurs MR sont exprimés dans l'hippocampe et dans d'autres régions du lobe limbique du cerveau (Reul and de Kloet, 1985). GR a un patron d'expression plus large à l'intérieur du cerveau, étant particulièrement abondant dans l'hypothalamus et dans les corticotropes (de Kloet *et al.*, 1998) où il est impliqué dans la rétroaction négative des glucocorticoïdes en conditions basales et de stress (Charmandari *et al.*, 2005). En effet, le récepteur de type II est non saturé dans les conditions basales et approche la saturation en condition de stress alors que le récepteur MR est saturé en conditions basales (Reul *et al.*, 1985). En absence de ligand, GR réside dans le cytoplasme de façon inactive et fait partie d'un complexe multiprotéique qui inclut la chaperone hsp90 (Bamberger *et al.*, 1996). La liaison du ligand à son récepteur GR induit une dissociation du complexe et la translocation de GR au noyau où il pourra lier les séquences régulatrices GRE (glucocorticoid response elements) de gènes cibles et réguler leur expression dépendamment du contexte génomique. GR peut également réguler des gènes cibles indirectement via une interaction physique et directe avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1 et NF- κ B (Bamberger *et al.*, 1996).

1.2.3.2 Les effets des glucocorticoïdes

L'action primaire des glucocorticoïdes sur le métabolisme des glucides est d'augmenter la production de glucose en stimulant la gluconéogenèse hépatique. Également, les glucocorticoïdes agissent sur le métabolisme des lipides et des protéines au niveau des cellules adipeuses et musculaires en stimulant la lipolyse et la protéolyse pour augmenter la disponibilité de substrats pour la gluconéogenèse. Les glucocorticoïdes exercent un puissant effet sur la régulation du système immunitaire. En effet, de fortes concentrations en glucocorticoïdes suppriment la majorité des réponses immunologiques et inflammatoires. Ils réduisent le nombre de lymphocytes, de monocytes, d'éosinophiles et de basophiles dans la circulation sanguine de même que leur accumulation aux sites

inflammatoires. Cette action suppressive des glucocorticoïdes semble être une conséquence de la réduction de la production de cytokines et d'autres médiateurs de la réponse immunologique et inflammatoire.

1.2.4 Les modèles murins d'études de l'axe

Les mécanismes physiologiques et moléculaires qui sont à la base du fonctionnement de l'axe ont été étudiés à l'aide de souris déficientes pour l'expression de ses gènes clés. Ces données ont permis de comprendre la fonction biologique de chacun de ces gènes *in vivo* d'un point de vue développemental et physiologique ainsi que dans le fonctionnement de l'axe HPA. De plus, ces modèles permettent de comprendre les dérèglements dus à une déficience et/ou un excès d'expression de ces gènes qui peuvent être associés à un état pathologique précis chez l'humain.

1.2.4.1 La souris CRH-/-

Les souris invalidées pour le gène de la CRH issues d'un croisement de parents hétérozygotes sont viables et fertiles et ne présentent pas de phénotype apparent. Les études histologiques montrent que ces souris présentent néanmoins une atrophie de la zone fasciculaire de leurs corticosurrénales en plus d'une réponse altérée au stress. En effet, les niveaux de corticostérone sont très faibles en conditions basales et n'atteignent pas les niveaux retrouvés chez les souris de type sauvage en condition de stress. Les niveaux d'ACTH plasmatiques et de POMC hypophysaires en conditions basales ne sont pas affectés chez ces souris suggérant que la CRH n'est pas essentielle à la transcription du gène POMC (Muglia *et al.*, 2000) de même que pour le développement des corticotropes. Par ailleurs, en condition de jeûne, les souris plongent rapidement en hypoglycémie et ne présentent pas d'élévation en corticostérone sanguin contrairement aux souris contrôles. Les croisements entre souris homozygotes entraînent la mort chez les nouveaux-nés à l'intérieur de douze heures après la naissance. Cette mort est causée par une dysplasie pulmonaire caractérisée par une hypercellularité des poumons, un épaississement des septa alvéolaires et un manque d'espace à l'intérieur des vésicules pulmonaires. Ce phénotype, observé chez les nouveaux-nés, peut être renversé par supplémentation des femelles homozygotes gestantes avec des glucocorticoïdes pendant la gestation (Muglia *et al.*, 1995). Des études précédentes ont déjà démontré la capacité des glucocorticoïdes de promouvoir la maturation des poumons *in vivo* (Ballard, 1989).

1.2.4.2 Les souris CRHR-/-

Il existe deux récepteurs pour la CRH, CRHR-1 et CRHR-2. La CRH a une plus grande affinité pour le récepteur CRHR-1 qui est fortement exprimé dans le cortex cérébral ainsi qu'à la surface des corticotropes ; l'urocortin lie le récepteur CRHR-2 avec une affinité quarante fois supérieure à celle de la CRH (Bale *et al.*, 2000) et il est très abondant dans les organes périphériques en plus d'être aussi exprimé plus faiblement dans le cerveau (Chalmers *et al.*, 1995;Hillebrand *et al.*, 2002).

Les souris invalidées pour le gène CRHR-1 ont aussi une atrophie de la zone fasciculaire de leurs corticosurrénales. Elles démontrent un faible taux de corticostérone plasmatique ainsi qu'une absence d'augmentation des niveaux d'ACTH et de corticostérone lorsqu'elles sont soumises à un stress important, caractéristique d'une déficience dans l'activation de leur axe HPA (Timpl *et al.*, 1998;Smith *et al.*, 1998).. Cette perte de réponse au stress n'est pas compensée par le CRHR-2. Le croisement des souris homozygotes entraîne aussi la mort des nouveaux nés par arrêt respiratoire dû à une dysplasie des poumons, engendrée par la déficience en corticostérone (Smith *et al.*, 1998). Par ailleurs, la perte du CRHR-2 n'aggrave pas le phénotype observé chez la souris invalidée pour le CRHR-1 (Preil *et al.*, 2001).

Les souris invalidées pour le gène CRHR-2 démontrent une hypersensibilité au stress (Bale *et al.*, 2000). Elles démontrent également une terminaison précoce de la relâche d'ACTH, suggérant que ce récepteur est impliqué dans le maintien de l'activation de l'axe. Finalement, ces souris ont une pression sanguine élevée, suggérant que le récepteur a un rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire (Coste *et al.*, 2000).

1.2.4.3 Les souris POMC-/-

Les souris invalidées pour le gène POMC ont été étudiées dans deux fonds génétiques, 129/SvEv et C57BL/6. Ces souris souffrent d'obésité et présentent un défaut de pigmentation uniquement dans le fond 129/SvEv. Macroscopiquement, les glandes surrénales de ces souris sont quasi invisibles. Les niveaux sanguins de corticostérone et d'aldostérone sont sous les niveaux détectables, indiquant une nécessité des peptides POMC pour la fonction de la corticosurrénale. Par ailleurs, les niveaux d'épinéphrine sont

significativement diminués suggérant une dysfonction sévère de la médullosurrénale chez ces souris (Yaswen *et al.*, 1999). Globalement, la perte de structure des glandes surrénales indique que les peptides dérivés de la POMC sont essentiels au développement et/ou au maintien des glandes.

Morphologiquement, les surrénales des souris POMC^{-/-} naissantes sont identiques à celles des souris contrôles. Toutefois, on dénote un arrêt de la prolifération des cellules de la glande après la naissance, causant l'atrophie des surrénales chez l'adulte. Une transplantation des surrénales à partir d'un nouveau-né POMC^{-/-} chez un nouveau-né surrénalectomisé résulte en des glandes pleinement fonctionnelles avec une morphologie normale, suggérant que les peptides dérivés de POMC sont requis pour la prolifération et le maintien des surrénales (Karpac *et al.*, 2005).

D'autre part, l'absence de la POMC entraîne une létalité partielle chez les nouveaux nés issus de croisement hétérozygotes et complète pour ceux provenant de croisements homozygotes, qui ne peut être évitée en supplémentant la mère en glucocorticoïdes. Un traitement de ces souris avec des injections d'ACTH ne permet pas de restaurer la sécrétion de corticostérone (Smart and Low, 2003). Le croisement des souris POMC^{-/-} avec les souris exprimant la EGFP sous le contrôle des séquences régulatrices du gène POMC montrent que les neurones exprimant la POMC tout comme les cellules corticotropes et mélanotropes sont présents, indiquant que l'expression de la POMC n'est pas nécessaire à la survie des cellules qui l'expriment (Smart *et al.*, 2003). Il est à noter que la souris POMC^{-/-} représente un excellent modèle animal d'étude puisque les caractéristiques phénotypiques qui y sont observés se retrouvent chez les patients humains atteints d'une déficience en POMC, permettant des analyses thérapeutiques et génétiques.

La restauration de l'expression de la POMC hypophysaire chez la souris POMC^{-/-} (POMC^{-/-};Tg⁺) ne contribue pas à améliorer le phénotype observé chez les souris POMC^{-/-}. En effet, les souris déficientes en POMC hypothalamique présentent un syndrome métabolique d'obésité aggravé qui se caractérise par une hyperphagie, une consommation réduite d'oxygène, une augmentation de dépôt de graisses sous-cutanées, viscérales et hépatiques, de même qu'une résistance sévère à l'insuline. Ce résultat suggère que les peptides dérivés de la POMC hypothalamique jouent un rôle critique dans l'homéostasie

énergétique. Par ailleurs, le traitement en glucocorticoïdes des souris POMC^{-/-} récapitule le phénotype observé chez la souris POMC^{-/-};Tg⁺, ce qui suggère que l'action permissive des glucocorticoïdes combinée à la déficience en POMC hypothalamique compte pour le phénotype observé (Smart *et al.*, 2006).

Les souris POMC^{-/-};Tg⁺ présentent une activité excessive de l'axe HPA démontrée par une hypertrophie de la zone fasciculaire de la corticosurrénale accompagnée d'un taux basal élevé de corticostérone et d'ACTH ainsi qu'une expression élevée de la CRH dans les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Ce phénotype a préalablement été observé chez les souris surexprimant la CRH (Feinmesser *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que les peptides dérivés de la POMC hypothalamiques sont requis pour réguler l'axe HPA via le contrôle de l'expression de la CRH dans les limites physiologiques (Smart *et al.*, 2007).

1.2.4.4 La souris GR^{-/-}

Les souris invalidées pour le récepteur des glucocorticoïdes (Grossman *et al.*, 2003) meurent en quelques heures après la naissance par insuffisance respiratoire due à un défaut développemental des poumons au jour e15.5. Cette observation est en concordance avec le fait que les glucocorticoïdes sont importants pour le développement embryonnaire des poumons (Brody and Williams, 1992). Ces souris présentent des défauts métaboliques, notamment au niveau de l'induction des gènes codant pour les enzymes essentielles de la gluconéogenèse hépatique. La régulation de l'axe HPA de ces souris est sérieusement perturbée due au manque de rétroaction négative par les glucocorticoïdes, résultant en des niveaux plasmatiques très élevés en ACTH. Ces souris présentent des glandes surrénales dont le cortex est hypertrophié et dépourvues des cellules chromaffines adrénérgiques, ce qui entraîne de haut niveau de corticostérone et un défaut de synthèse d'adrénaline (Cole *et al.*, 1995).

1.3 La pro-opiomélanocortine

L'expression de cette pro-hormone joue un rôle crucial dans le bon fonctionnement de l'axe HPA. Par ailleurs, on lui associe de multiples autres fonctions via ses dérivés peptidiques qui sont exprimés dans des tissus autres que l'hypophyse et qui contribuent à

des fonctions distinctes. La pro-opiomélanocortine est exprimé principalement dans l'hypophyse, précisément dans les corticotropes et mélanotropes du lobe antérieur et intermédiaire, respectivement (Krieger *et al.*, 1980), et dans les neurones du noyau arqué et de la région paraventriculaire de l'hypothalamus (Gee *et al.*, 1983). Des peptides dérivés de la POMC sont également retrouvés dans des tissus extracrâniens incluant la peau, les testicules, les ovaires, le placenta, les cellules lymphoïdes et les surrénales (Drouin *et al.*, 1989a).

1.3.1 La structure du gène POMC

Chez les mammifères, le gène POMC est présent en une seule copie par génome haploïde incluant le bovin, l'homme, le rat, la souris et le cochon (Drouin *et al.*, 1989a). Le génome de la souris contient également un pseudogène qui n'est pas exprimé (Uhler *et al.*, 1983). Dans le génome de la souris, le gène POMC est localisé sur le chromosome 12. Il contient trois exons séparés par deux introns. Le premier exon correspond à la partie 5' non-traduite de l'ARNm (5'-UTR). Le second exon contient la suite du 5'-UTR suivi du site d'initiation de la traduction, de la séquence du peptide signal, nécessaire pour la translocation du peptide naissant dans le réticulum endoplasmique rugueux, et enfin les premiers acides aminés du fragment peptidique N-terminal (NT). Le dernier exon encode la portion C-terminale du fragment NT, le peptide de jonction (JP), les séquences codantes pour l'ACTH et la β -lipotropine (LPH), le codon de terminaison et la portion 3' non-traduite (3'-UTR) (Chang *et al.*, 1980;Autelitano *et al.*, 1989;Bertagna, 1994). L'ARNm du gène POMC retrouvé dans l'hypophyse et le cerveau a une taille de 1100 nucléotides alors que les transcrits provenant des tissus extracrâniens sont plutôt hétérogènes en taille. Cette hétérogénéité peut résulter d'épissage alternatif, de variation dans la longueur de la queue poly-A ou l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription (DeBold *et al.*, 1988;Autelitano *et al.*, 1989;Chang *et al.*, 1989;Clark *et al.*, 1989).

Trois promoteurs P1, P2 et P3 ont été identifiés en amont du gène POMC, donnant naissance à des transcrits d'ARNm de 1100, 800 et 1350 nucléotides respectivement. Le promoteur hypophysaire P1 dont il sera question plus loin dans le texte est situé à la jonction du premier exon et génère le transcrit de 1100 nucléotides contenant les 3 exons après épissage des introns. Le promoteur P2, caractérisé chez l'humain et le rat, est localisé en position 3' de l'intron 2 (White *et al.*, 1990), générant un transcrit de 800-900

nucléotides qui débute en position 5' de l'exon 3 (Jingami *et al.*, 1984; Jeannotte *et al.*, 1987). Ce court transcrit est retrouvé dans les tissus extra crâniens et encode pour une protéine sans peptide signal dont le rôle physiologique est inconnu. Enfin, le promoteur P3 qui produit un grand transcrit de 1350 nucléotides, se situe en amont du promoteur hypophysaire P1 et génère le même peptide que ce dernier. Ce promoteur a été identifié comme étant actif dans les cellules de tumeurs extra hypophysaires sécrétant de l'ACTH (de *et al.*, 1985).

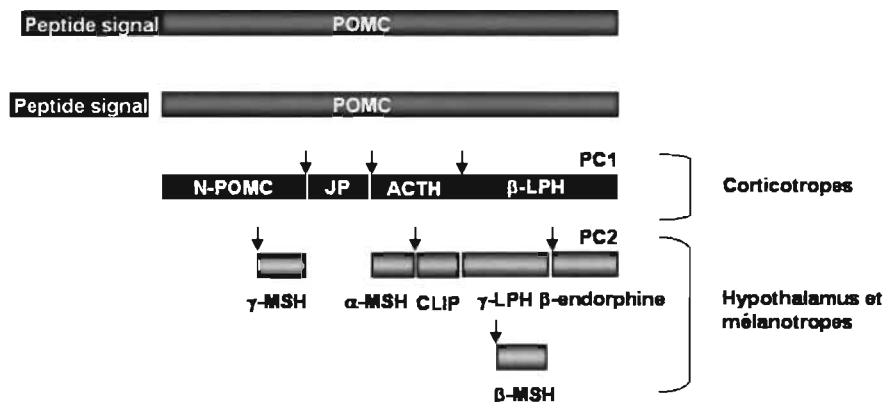


Figure 1.3 : Clivage de la POMC dans l'hypophyse et l'hypothalamus. L'expression de PC1 dans les corticotropes génère un fragment N-terminal, le peptide JP, l'ACTH et la β -lipotropine (β -LPH). Dans l'hypothalamus et les mélanotopes, le clivage par PC2 produit l' α -MSH et CLIP (à partir de l'ACTH), la β -MSH et la β -endorphine (à partir de la β -LPH) et la γ -MSH (à partir du fragment N-terminal).

1.3.2 La POMC et ses dérivés

L'ARNm POMC de 1100 nucléotides code pour un polypeptide de 30 kDa qui représente le précurseur de l'ACTH, les endorphines, les mélanotropines MSH et les lipotropines LPH (Figure 1.3, page 16). Ces peptides sont générés via des étapes de maturation successives et des modifications post-traductionnelles qui sont cellulaires spécifiques. Dans l'hypophyse, la maturation biosynthétique de la pro-hormone POMC débute avec les clivages spécifiques après les paires de résidus basiques lysine-arginine ou arginine-arginine par les convertases PC1 et PC2. Dans les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, le précurseur peptidique POMC est clivé par PC1 pour générer le fragment NT, le peptide JP, l'ACTH, et la β -LPH. Dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse, il y a coexpression des convertases PC1 et PC2, en plus de la

carboxypeptidase E et des enzymes d'amidation et d'acétylation qui induisent des digestions supplémentaires permettant d'obtenir la γ -MSH à partir du fragment NT, l' α -MSH et CLIP « corticotropin-like intermediate lobe peptide » provenant de l'ACTH et enfin la β -MSH et la β -endorphine qui dérive de la β -LPH (Castro and Morrison, 1997).

1.3.3 Les récepteurs des mélanocortines

Les peptides agissent sur les tissus cibles via des récepteurs spécifiques couplés aux protéines à sept passages transmembranaires. Jusqu'à présent, cinq récepteurs ont été décrits. Le récepteur MC1R a comme principal ligand l' α -MSH et est exprimé dans les mélanocytes, les macrophages, les adipocytes, les kératinocytes et les fibroblastes. L'ACTH agit via le récepteur MC2R qui est exprimé dans les glandes surrénales et à la surface des adipocytes. MC3R est exprimé dans les neurones arqués de l'hypothalamus, le placenta, le duodénum, le pancréas et l'estomac. Ses principaux ligands sont l' α -, β - et γ -MSH. L' α - et la β -MSH sont les principaux ligands du MC4R qui est exprimé dans le cerveau, les muscles et la moelle épinière. Enfin, MC5R est principalement exprimé dans les glandes sébacées et dans le cerveau et a comme principal ligand l' α -MSH (Millington, 2006).

1.3.4 La POMC hypophysaire

Les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse synthétisent et sécrètent l'ACTH, produite à partir du précurseur peptidique POMC. L'ACTH circulant agit sur les corticosurrénales via son récepteur membranaire MC2R pour stimuler la stéroïdogénèse. Ce récepteur est principalement exprimé dans les corticosurrénales et médie les effets de l'ACTH sur la synthèse et la relâche des glucocorticoïdes dans la circulation sanguine. Des patients avec une déficience familiale en glucocorticoïdes ont été associés avec des mutations dans le gène *MC2R* (Weber et al., 1995).

1.3.5 La POMC hypothalamique et l'homéostasie énergétique

L'expression du gène POMC dans le cerveau est localisée dans une sous-population de neurones du noyau arqué de l'hypothalamus ainsi que dans le noyau du tractus solitaire. Les bases fonctionnelles du rôle de la POMC dans le contrôle de l'appétit et de l'homéostasie énergétique sont largement dues aux interactions entre les peptides dérivés

de la POMC dans le cerveau, dont le principal est l' α -MSH, et les récepteurs neuroendocriniens spécifiques MC3R et MC4R. En effet, des mutations ont été retrouvées dans le gène de la POMC chez des patients humains atteints d'obésité sévère, un phénotype que l'on retrouve chez les modèles murins de déficience en POMC (Yaswen *et al.*, 1999). Dans le même ordre d'idées, des mutations du gène MC4R ont été retrouvées chez l'humain et la souris et associées au phénotype sévère d'obésité (Vaisse *et al.*, 1998;Cone, 1999). Le rôle de ce récepteur se situe au niveau du contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme. Ces observations concordent avec le phénotype des souris homozygotes invalidées pour les récepteurs MC3R ou MC4R qui sont obèses (Huszar *et al.*, 1997;Butler *et al.*, 2000).

1.3.6 Rôles cutanés des produits de la POMC

Un des rôles bien documentés des peptides POMC est la stimulation de la mélanogénèse. Le ratio de la phéomélanine (pigments jaune et rouge) et d'eumélanine (pigments brun et noir) détermine la couleur de la peau et des poils chez les mammifères et il est modulé notamment par l' α -MSH. L' α -MSH provient du lobe intermédiaire de l'hypophyse chez les mammifères ayant un lobe intermédiaire au stade adulte alors que chez l'humain, ce peptide est produit localement par les cellules de la peau. Ce peptide stimule la mélanogénèse via son récepteur MC1R présent à la surface des cellules de la peau. Des mutations de perte ou de gain de fonctions de ce récepteur altèrent la pigmentation chez plusieurs espèces de mammifères. Les humains ayant des variants du gène *MC1R* ont souvent les cheveux roux et la peau très pâle (Cone *et al.*, 1996;Harding *et al.*, 2000). Par ailleurs, de nombreuses études cliniques ont démontré que les syndromes entraînant une production excessive des autres peptides dérivant de la POMC tel que retrouvée chez les patients humains atteints de la maladie d'Addison ou du syndrome de Nelson cause une hyperpigmentation et une atrophie de la peau. L' α -MSH a également un rôle suppresseur sur le système immunitaire en inhibant la production ou l'action des facteurs pro-inflammatoires et en stimulant la production des molécules au potentiel immunosuppresseur via une interaction avec le récepteur MC1R présent à la surface de plusieurs cellules telles les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales (Slominski *et al.*, 2000). Enfin, les mélanocortines de la peau stimulent la production de lipides par les glandes sébacées via le récepteur MC5R (Chen *et al.*, 1997b).

1.4 Régulation transcriptionnelle basale et histo-spécifique du gène POMC

L'étude des mécanismes transcriptionnels du gène de la POMC s'est avérée être une avenue intéressante pour la compréhension du développement hypophysaire. En effet, l'étude du promoteur a permis d'une part d'identifier les éléments régulateurs essentiels pour la spécificité d'expression et d'autre part de cloner les facteurs responsables de l'activité du promoteur et participant au processus de différenciation hypophysaire.

1.4.1 Le promoteur du gène POMC

Les 706 paires de bases en amont du gène du POMC de rat ont été montrées comme étant suffisantes pour l'expression hypophysaire chez les souris transgéniques (Tremblay *et al.*, 1988). En utilisant les cellules AtT-20, modèle de cellules corticotropes, les séquences minimales du gène POMC conférant l'histospécificité hypophysaire ont été délimitées. Ce promoteur comprend la région -480 à +63, la partie -34 à +63 représentant le promoteur minimal (Jeannotte *et al.*, 1987). La spécificité hypophysaire de ce promoteur a été confirmée *in vivo* à l'aide de souris transgéniques, par une forte pénétrance du transgène dans les corticotropes et les mélanotropes (Hammer *et al.*, 1990). Cependant, le promoteur -480/+63 n'est pas actif dans les neurones de l'hypothalamus. L'expression de la POMC hypothalamique requiert deux séquences distales conservées nommées « enhancers » localisées de 10 à 12 kb en amont du site d'initiation de la transcription (de Souza *et al.*, 2005).

1.4.2 Régulation de la transcription de base

Le promoteur a été subdivisé en quatre domaines, soient distal (-480/-323), central (-323/-166), proximal (-166/-34) et minimal (-34/+63) (Jeannotte *et al.*, 1987) (Figure 1.4, page 20). L'activité transcriptionnelle du promoteur dépend principalement des domaines distal et central. Des études exhaustives du promoteur ont permis de disséquer les éléments essentiels pour l'activité et l'histospécificité transcriptionnelle du gène dans les cellules AtT-20 (Therrien and Drouin, 1991; Kraus *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). De façon à mettre en évidence la présence d'éléments régulateurs de la transcription au sein de ces domaines, des études de « footprinting » et des analyses fonctionnelles par mutagenèse ont été réalisées (Therrien and Drouin, 1991). Un fait étonnant est la mise en évidence d'une

dizaine d'éléments régulateurs qui contribuent collectivement à l'activité du promoteur -480/+63 et dont la contribution relative semble être quantitativement similaire (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993). En effet, ces études ont démontré que la mutation individuelle de ces éléments régulateurs diminue significativement l'activité du promoteur sans toutefois l'éliminer. Ces données suggèrent que les interactions protéine : protéine entre les facteurs de transcription présents au promoteur du gène POMC sont essentielles à l'activation transcriptionnelle. Plusieurs protéines liant les nombreux sites caractérisés dans le promoteur ont été identifiées telles COUP-TF, Sp1, AP-2-like, AP-1, PO-B, le facteur PP1, Brn3.0 et E2F1 (Drouin *et al.*, 1989b; Riegel *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1990; Therrien and Drouin, 1991; Boutillier *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992; Gerrero *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Picon *et al.*, 1999). La majorité de ces facteurs ont un patron d'expression ubiquitaire, ce qui suggère que leur rôle se situe dans la régulation de la transcription basale du promoteur.

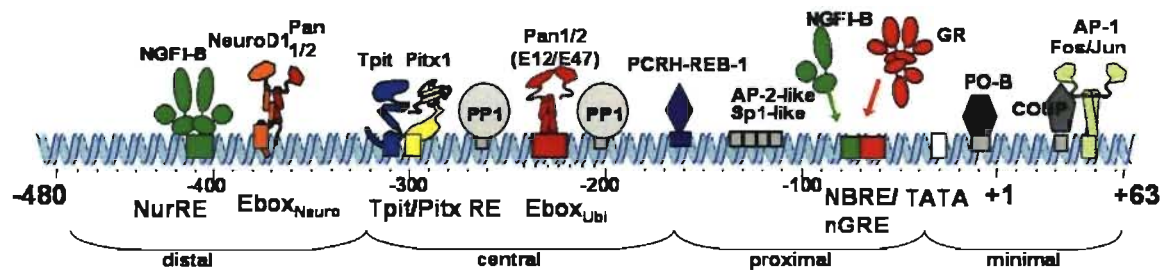


Figure 1.4 : Représentation schématique du promoteur du gène POMC et des facteurs contribuant à la transcription basale et histospécifique. La spécificité d'expression du gène POMC requiert les facteurs NeuroD1, Pitx1 et Tpit.

1.4.3 Régulation histospécifique

Une analyse détaillée des domaines distal et central a révélé que la spécificité cellulaire et la synergie transcriptionnelle reposent principalement sur un seul élément présent dans chaque domaine (Therrien and Drouin, 1993; Lamonerie *et al.*, 1996). Il s'agit du DE-2 (-414/-387) dans le domaine distal du promoteur qui contient le motif CANNTG, caractéristique d'une boîte E. Cette boîte E n'est active que dans les cellules AtT-20, un modèle de cellule corticotropes exprimant la POMC. La recherche des facteurs bHLH qui

lient cet élément a montré qu'ils ont une distribution cellulaire restreinte et ce complexe HLH putatif a été nommé CUTE (corticotroph upstream transcription element). L'étude de ce complexe a révélé qu'il contient entre autres le facteur bHLH neurogénique NeuroD1 (Poulin *et al.*, 1997). L'élément régulateur clef du domaine central s'est avéré être le CE-3 qui en combinaison avec le DE-2, permet de reconstituer la synergie transcriptionnelle corticotrope spécifique. L'utilisation du CE-3 comme sonde a permis d'identifier les protéines pouvant lier cette sonde. C'est ainsi que Pitx1 a été cloné (Lamonerie *et al.*, 1996). Enfin, Tpit a été cloné en tant que partenaire de Pitx1 sur le CE-3 (Lamolet *et al.*, 2001).

1.4.3.1 Le facteur bHLH NeuroD1

NeuroD1 est un facteur de transcription de type bHLH classe B qui est exprimé dans le pancréas pour le contrôle de l'histo-spécificité transcriptionnelle du gène de l'insuline (Naya *et al.*, 1995), dans les cellules endocrines de l'intestin où il régule l'expression du gène de la sécrétine (Mutoh *et al.*, 1997), dans diverses régions du système nerveux où il est impliqué dans la différenciation neuronale tardive (Lee *et al.*, 1995a) et dans différentes lignées adénohypophysaires dont les cellules corticotropes (Poulin *et al.*, 1997). Les facteurs bHLH contiennent des domaines structuraux propres : un domaine riche en acides aminés basiques qui est requis pour la reconnaissance du site d'ADN et d'un domaine de type HLH conservé qui représente une interface de dimérisation. Les membres de cette famille se subdivisent en trois classes, A, B et C. Les facteurs ubiquitaires constituent la classe A. Les facteurs de la classe B ont un patron d'expression histo-spécifique. Les membres de la classe A lient l'ADN en homodimère ou en hétérodimère avec les membres de la classe B alors que les membres de la classe B n'hétérodimérisent qu'avec les membres de la classe A (Lassar *et al.*, 1991). Enfin, les facteurs de la classe C ont un domaine leucine zipper en position C-terminale relativement au domaine HLH (Hamamori *et al.*, 1997).

Précédemment, il a été montré que la transcription corticotrope spécifique du gène POMC était dépendante de l'action du bHLH cellule spécifique NeuroD1 en association avec des bHLHs ubiquitaires. Des études de retardement sur gel ont montré que ces protéines étaient incluses dans le complexe appelé CUTE. NeuroD1 hétérodimérise avec les facteurs bHLHs ubiquitaires de classe A, tels que E12 et E47, pour lier la boîte E_{Neuro}

présente dans le domaine distal du promoteur du gène POMC et ainsi activer la transcription en interagissant directement avec les co-activateurs pRb et p107 (Poulin *et al.*, 1997; Poulin *et al.*, 2000; Batsche *et al.*, 2005b). NeuroD1 n'est pas requis pour l'activation transcriptionnelle du gène POMC puisqu'une substitution de la boîte E_{Neuro} en boîte E_{ubiquitaire} n'affecte pas l'activité du promoteur. Le rôle de NeuroD1 dans la spécificité cellulaire se situe au niveau de la reconnaissance de la boîte E_{Neuro} dans le domaine distal du promoteur (Poulin *et al.*, 2000). Il se lie au site GCAGATGG dont la séquence consensus est CANNTG. L'expression hypophysaire de NeuroD1 débute au jour e12 et diminue vers e16. La souris NeuroD1^{-/-} présente un retard de différenciation des cellules corticotropes d'environ trois jours, suggérant que NeuroD1 contribue de façon transitoire à la différenciation des corticotropes (Lamolet *et al.*, 2004).

1.4.3.2 Le facteur à homéodomaine Pitx1

La séquence de son homéodomaine identifie Pitx1 comme faisant partie de la grande classe *paired* des gènes à homéoboîte, de la sous-classe *bicoïde*. Pitx1 avec Pitx2 et Pitx3 forment la sous-famille *Pitx* (Duboule, 1994). Pitx2 et Pitx3 partagent une grande identité de séquence avec Pitx1 au niveau de leur homéodomaine, soit 95 et 93 % respectivement. Au cours du développement, Pitx1 est exprimé au niveau du stomodaeum, l'ectoderme précoce, et dans tous ses dérivés dont la poche de Rathke (Lanctot *et al.*, 1997). Il en découle une expression dans toutes les lignées hypophysaires (Lamonerie *et al.*, 1996). Pitx2 est également exprimé dans l'hypophyse mais possiblement absent des cellules corticotropes (Tremblay *et al.*, 1998) et pourrait ainsi participer à des fonctions redondantes dans l'hypophyse. En effet, l'inactivation de Pitx1 chez la souris cause un retard dans l'expansion des lignées gonadotropes et thyrotropes en plus d'une augmentation des cellules corticotropes mais n'affecte en rien l'organogenèse (Szeto *et al.*, 1999). Cependant, l'inactivation des gènes Pitx1 et Pitx2 entraîne un défaut d'expansion de la poche de Rathke suggérant que l'organogenèse hypophysaire dépend de la redondance fonctionnelle de ces facteurs (Suh *et al.*, 2002). Pitx1 est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes hypophysaires via des interactions protéine:protéine. Entre autres, Pitx1 peut interagir avec le facteur de transcription SF-1 dans la lignée gonadotrope et activer le promoteur du gène qui encode la sous-unité β de la LH. De la même façon, il peut interagir avec le facteur Pit-1 pour activer le gène de la prolactine. (Tremblay *et al.*, 1998; Szeto *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 1999; Tremblay and Drouin,

1999; Tremblay *et al.*, 2000).

Pitx1 a été cloné suite à l'analyse de l'élément régulateur du domaine central responsable de la spécificité cellulaire transcriptionnelle (Lamonerie *et al.*, 1996). Il lie le promoteur en monomère via le site TAAGCC du CE-3 et active la transcription du gène POMC. Dans le contexte du promoteur -480/+63, la synergie observée entre les domaines central et distal, résulte d'une interaction directe entre Pitx1 et un hétérodimère de facteurs de transcription de type bHLH (basic helix loop helix) contenant NeuroD1 (Poulin *et al.*, 2000). Cette protéine joue donc un rôle central au promoteur dans la spécificité d'expression du gène POMC via ses interactions protéine:protéine avec les facteurs de transcription du domaine distal plutôt que par son patron d'expression.

Le contrôle de la différenciation des différentes lignées hypophysaires dépend de facteurs de transcription restreints aux lignées hypophysaires et ces mêmes facteurs jouent aussi un rôle dans la transcription des gènes qui encodent les hormones spécifiques de ces lignées (Mullis, 2001). Les facteurs Pitx1 et NeuroD1 ne permettent pas, à eux seuls, de fournir une explication moléculaire quant à la différenciation de la lignée corticotrope. En effet, l'élément CE-3 confère une grande stringence en terme d'activité histo-spécifique mais le patron d'expression de Pitx1 ne permet pas d'expliquer l'expression corticotrope spécifique de la POMC.

1.4.3.3 Le facteur à boîte T Tpit

L'analyse de la séquence de l'élément CE-3 a révélé la présence du motif TCACACCA, un demi-site pour un facteur de transcription à boîte T. Par une technique de polymérisation en chaîne avec des oligonucléotides dégénérés encadrant le domaine de liaison à l'ADN du facteur putatif à boîte T, Lamolet et coll. ont pu cloner Tpit, un facteur de transcription strictement restreint aux lignées hypophysaires exprimant la POMC. Ainsi, Pitx1 active la transcription du gène POMC en synergie avec le facteur de transcription à boîte T Tpit via une interaction protéine:protéine directe (Lamolet *et al.*, 2001). Le site de Tpit est distant de 6 paires de bases du site de Pitx1. Tpit est exclusivement exprimé dans les cellules hypophysaires exprimant la POMC, c'est-à-dire les corticotropes et mélanotropes. Son expression, précédant celle de la POMC, débute au jour e12.5 dans les corticotropes et au jour e15.5 dans les mélanotropes et est maintenue chez l'adulte. Le rôle

de *Tpit* dans la différenciation des cellules POMC hypophysaires a été validé par une expérience de transgénèse de gain de fonction. L'expression de *Tpit* a été ciblée dans les cellules de la pointe rostrale de l'hypophyse contenant des cellules non différenciées (Nemeskeri *et al.*, 1988) qui expriment *Pitx1*, sous le contrôle du promoteur de l' α -GSU. L'expression ectopique de *Tpit* dans cette structure est suffisante pour induire l'expression du gène POMC mais insuffisante pour induire les facteurs corticotropes tel *NeuroD1* (Lamolet *et al.*, 2001). L'inactivation génique du gène *TPIT* chez la souris résulte en un défaut de différenciation terminale des corticotropes et des mélanotropes; le nombre de cellules hypophysaires exprimant la POMC est considérablement réduit mais leur détermination n'est pas affectée. Par ailleurs, il en découle une présence ectopique de cellules gonadotropes dans le lobe intermédiaire. Ce résultat suggère un rôle pour *Tpit* de répresseur du programme de différenciation gonadotrope. La mécanistique de ce rôle implique une capacité de *Tpit* de *trans*-réprimer l'activité du marqueur gonadotrope SF-1 (Pulichino *et al.*, 2003b). L'absence de *Tpit* chez ces souris entraîne également une déficience hormonale en ACTH associée à une déficience en glucocorticoïdes (Pulichino *et al.*, 2003a). Des patients humains ayant des mutations dans le gène *TPIT* souffrent des mêmes déficiences hormonales retrouvées chez la souris *Tpit*^{-/-} qui incluent des taux plasmatiques faibles en ACTH et cortisol et un état hypoglycémique.

1.5 Régulation transcriptionnelle hormonale du gène POMC

Dans une hypophyse adulte, la régulation de l'expression du gène POMC est soumise à un contrôle hormonal précis qui assure une réponse adéquate au stress. Cette régulation endocrine dépend d'un équilibre entre les signaux activateurs déclenchés par la CRH qui permet une activation de la transcription du gène POMC et l'effet inhibiteur induit par les glucocorticoïdes qui, par leurs récepteurs GR, répriment la transcription et exercent un rétro-contrôle négatif sur l'axe HPA. Cette section portera premièrement sur les acteurs impliqués dans cette régulation hormonale et leurs fonctions biologiques. Ceux-ci incluent les récepteurs nucléaires dont GR et les membres de la sous-famille Nur et les co-activateurs transcriptionnels des familles SRC/p160 et TIF1. La suite de cette section se penche sur les mécanismes moléculaires responsables de cette régulation transcriptionnelle hormonale.

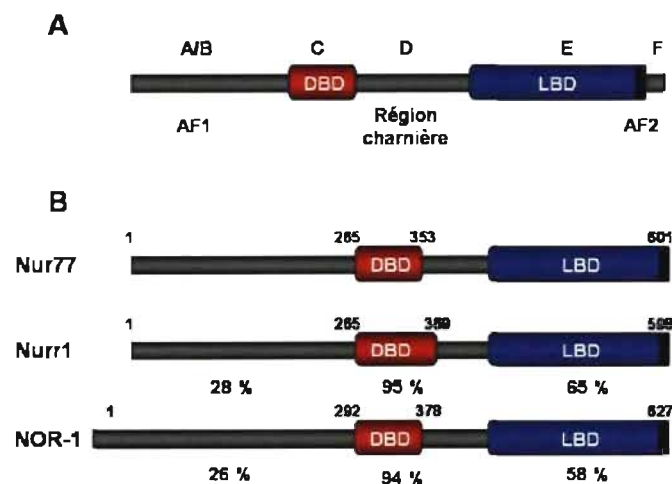


Figure 1.5 : Structure générale des récepteurs nucléaires et des membres de la sous-famille NGFI-B. A) Les récepteurs nucléaires contiennent plusieurs domaines fonctionnels dont l'AF1, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région charnière, le domaine de liaison au ligand (LBD) et l'AF2. B) Alignement de séquence en acides aminés et identité de séquence entre les membres de la sous-famille NGFI-B.

1.5.1 Les récepteurs nucléaires

Les hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes, les rétinoïdes, la vitamine D, les prostaglandines et les acides biliaires ont des rôles importants dans la régulation d'une variété d'événements développementaux et de fonctions physiologiques tels que l'homéostasie, l'organogenèse, le développement et la reproduction. Ces rôles sont accomplis par leur récepteur nucléaire respectif.

1.5.1.1 Structure générale

Les récepteurs nucléaires sont composés de quatre domaines fonctionnels : le domaine modulateur (domaine A/B), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région charnière et le domaine de liaison du ligand (LBD) (Figure 1.5 A, page 25). Le domaine A/B contient un domaine d'activation transcriptionnelle appelé AF-1 qui est ligand indépendant. Ce domaine possède une activité qui est dépendante du contexte cellulaire et du promoteur (Tora *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1990). Le LBD est un domaine multifonctionnel qui permet la liaison du ligand, la dimérisation, l'interaction avec les protéines de type chaperone, la localisation nucléaire et les fonctions transactivatrices. La

transactivation ligand dépendante nécessite la présence d'un motif hautement conservé, l'AF-2, et implique le recrutement de co-activateurs.

1.5.1.2 Mécanismes d'action généraux

Les récepteurs nucléaires lient l'ADN sous forme de monomère, homodimère et hétérodimère (Glass, 1994). Les sites de liaisons pour les récepteurs nucléaires sont connus sous le nom d'élément de réponse hormonale (HRE). La disposition de telles séquences pour l'interaction d'un dimère peut se configurer en palindrome, en palindrome inversé ou en répétition directe. D'une part, les récepteurs stéroïdiens incluant les récepteurs aux oestrogènes ER α et ER β , les récepteurs de la progestérone PR-A et PR-B, le récepteur de l'androgène AR, les récepteurs aux glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes GR et MR respectivement forment des homodimères suite à la liaison de leur ligand respectif et lient leur HRE. D'autre part, il y a les récepteurs qui forment des hétérodimères avec le récepteur RXR, tels que le récepteur à l'hormone thyroïdienne TR, le récepteur de l'acide rétinoïque RAR et le récepteur à la vitamine D VDR (Mangelsdorf and Evans, 1995).

L'activité des récepteurs nucléaires peut être contrôlée par différents mécanismes généraux : 1) la liaison d'un ligand liposoluble par le récepteur ou son partenaire au sein d'un complexe d'hétérodimère; 2) des modifications covalentes telle que la phosphorylation régulées par des voies de signalisation activées par des signaux extracellulaires; 3) des interactions protéine:protéine généralement avec d'autres facteurs de transcription. Ces mécanismes peuvent fonctionner individuellement ou de concert pour répondre à un stimulus spécifique. Le modèle décrivant le mode d'action d'un récepteur nucléaire propose que le récepteur soit localisé au cytoplasme dans un état inactif et interagissant avec des protéines chaperoniques de type « heat shock » qui, suite à la liaison de son ligand, transloque au noyau et permet de réguler ses gènes cibles (Pratt and Toft, 1997). Cependant, la plupart des récepteurs stéroïdiens sont présents de façon constitutive au noyau. Ces récepteurs peuvent former des complexes avec des protéines accessoires de types chaperones, incluant les hsp70 et hsp90, ceci limitant leur accès à l'ADN pour la régulation transcriptionnelle (Chambraud *et al.*, 1990; Landel *et al.*, 1994). Ils peuvent également être liés à l'ADN en absence de ligand et agir comme des répresseurs transcriptionnels via le recrutement de corépresseurs. La liaison de leur ligand induit une dissociation du complexe répresseur, permettant au récepteur d'interagir avec des co-

activateurs pour activer la transcription. Enfin, un récepteur nucléaire stéroïdien, tel que démontré dans le cas de ER, peut recruter des corépresseurs ligand-dépendants comme LCoR et RIP140 afin d'initier la répression transcriptionnelle via le recrutement subséquent de protéines aux fonctions répressives (White *et al.*, 2004).

1.5.2 Les co-régulateurs transcriptionnels

La biologie des récepteurs nucléaires repose entre autres sur les protéines (i.e. co-activateurs ou co-répresseurs) qui interagissent avec eux pour moduler leur activité transcriptionnelle. Les dix dernières années ont permis l'élucidation d'un grand nombre de complexes de co-activateurs et de co-répresseurs qui ont été identifiés biochimiquement et fonctionnellement (McKenna *et al.*, 1999; Glass and Rosenfeld, 2000). Ces études ont aussi révélé que ces protéines co-régulatrices sont des composants de complexes multiprotéiques qui possèdent une grande diversité en terme d'activités enzymatiques qui contribuent à la transcription. Ces activités enzymatiques agissent à plusieurs niveaux : modification et remodelage de la chromatine, initiation de la transcription, élongation des chaînes d'ARN, épissage de l'ARN (Monsalve *et al.*, 2000), traduction de l'ARNm (Yu *et al.*, 2007) et terminaison de la réponse transcriptionnelle. Parmi ces activités enzymatiques, citons entre autres l'activité d'acétylation et de désacétylation des histones et d'autres protéines présentes au promoteur (McKenna *et al.*, 1999), la méthylation et la déméthylation des histones, la phosphorylation et la déphosphorylation, l'activité des poly(ADP)ribosylases, l'addition d'ubiquitines et de SUMO et enfin l'activité de remodelage de la chromatine ATP dépendant (Rosenfeld *et al.*, 2006). Enfin, certains co-activateurs tels que le complexe médiateur TRAP peuvent agir comme adaptateurs entre les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle de base (Ito and Roeder, 2001). Les interactions entre co-régulateurs et facteurs de transcription peuvent être contrôlées à plusieurs niveaux incluant l'expression du co-régulateur, les modifications post-traductionnelles des co-régulateurs et de leurs cibles d'interaction, et par la liaison du ligand dans le cas des récepteurs nucléaires. De nombreuses études ont été réalisées pour élucider les mécanismes d'activation de la transcription par les co-activateurs à l'étape de l'initiation. Pendant l'initiation, la structure de la chromatine du locus du gène cible subit des altérations sous l'action de différents co-activateurs par leur activité histone acétyltransférase et méthyltransférase et par les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Ces co-activateurs aux propriétés enzymatiques distinctes sont recrutés séquentiellement selon un ordre bien précis

et de façon combinatoire. Ils réorganisent la chromatine, modifient et recrutent la machinerie transcriptionnelle de base (Wu, 1997;Shang *et al.*, 2000;Metivier *et al.*, 2003).

1.5.2.1 La famille SRC/p160

La famille SRC/p160 représente la famille de co-régulateurs de la transcription qui a été le plus étudiée et caractérisée au cours des dernières années. Trois membres homologues de la famille SRC/p160 ont été identifiés chez les humains et les rongeurs. SRC-1 a été cloné via sa capacité d'interagir avec les récepteur nucléaires PR, ER ou TR liés à leur ligand (Onate *et al.*, 1995;Takeshita *et al.*, 1996). SRC-2 a été cloné via son interaction avec le LBD de GR et ER (Hong *et al.*, 1996;Voegel *et al.*, 1996). SRC-3 a été identifié dans une région chromosomique amplifiée d'une lignée cellulaire cancéreuse humaine (Anzick *et al.*, 1997). Les trois protéines ont une taille d'environ 160 kDa; ils partagent une similarité de séquence d'environ 50 % et une identité de 43-48 % (Xu and Li, 2003). La région centrale, conservée entre les membres de la famille, contient trois motifs conservés LXXLL qui sont requis pour l'interaction ligand dépendante avec les récepteurs nucléaires (Heery *et al.*, 1997;Voegel *et al.*, 1998). Ces protéines contiennent deux domaines d'activation intrinsèques, AD1 et AD2. AD1 est responsable de l'interaction avec les facteurs CBP et p300 (Onate *et al.*, 1998); AD2 permet l'interaction avec deux histones méthyltransférases, CARM1 et PRMT1 (Koh *et al.*, 2001). Enfin, le domaine C-terminal de SRC-1 et SRC-3 contient une activité histone acétyltransférase (Spencer *et al.*, 1997;Chen *et al.*, 1997a). Les SRCs semblent jouer un rôle majeur dans le remodelage de la chromatine et l'assemblage des facteurs généraux de transcription via des recrutements direct et indirect d'autres co-activateurs (Rosenfeld and Glass, 2001).

1.5.2.1.1 Rôles biologiques

Plusieurs phénotypes majeurs ont été observés chez les souris invalidées pour les membres de la famille SRC, dont des dérèglements dans la physiologie de l'axe HPA. Les souris SRC-1^{-/-} démontrent une résistance partielle aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes (Xu *et al.*, 1998;Weiss *et al.*, 1999). L'axe HPA de ces souris est perturbé au niveau du rétro-contrôle négatif par les glucocorticoïdes. En effet, en condition de stress, la déficience en SRC-1 entraîne une augmentation significative des niveaux de corticostérone sans affecter le niveau sanguin d'ACTH. Cette perte du rétro-contrôle négatif est également démontrée par l'incapacité des glucocorticoïdes de réprimer les niveaux de transcripts

hypophysaires du gène POMC lors d'un test réponse à la dexaméthasone (Winnay *et al.*, 2006). Les souris SRC2^{-/-} sont hypofertiles. Les mâles ont des défauts de spermatogenèse et une dégénération des testicules; les femelles ont un placenta hypoplasique. De plus, le métabolisme lipidique de ces souris est perturbé. En effet, la perte du gène SRC-2 entraîne chez ces souris une capacité de se protéger contre l'obésité : ces souris ont une lipolyse accélérée des graisses blanches et une dépense énergétique supérieure des graisses brunes, une sensibilité accrue à l'insuline et une faible capacité d'accumuler les graisses (Picard *et al.*, 2002; Gehin *et al.*, 2002). L'axe HPA des souris SRC-2^{-/-} est hyperactivé, démontré par une expression élevée des composants régulateurs de l'axe tels la CRH, l'AVP et l'ACTH en condition basale. Ces souris ont des niveaux faibles de glucocorticoïdes plasmatiques et présentent un défaut de réponse précoce de sécrétion de corticostérone lorsque soumises à un stress. Ce problème est associé à des aberrations de structure et fonction des surrénales, particulièrement de la zone fasciculaire et des enzymes clefs de la stéroïdogénèse (Patchev *et al.*, 2007). Les souris invalidées pour le gène SRC-3 démontrent un retard de croissance général. Les femelles démontrent un délai du stade pubertaire et sont peu fertiles. En plus, elles ont des niveaux faibles en estrogène et ont un retard de croissance des glandes mammaires (Xu *et al.*, 2000). Il est important de noter que les souris invalidées pour SRC-1, SRC-2 ou SRC-3 sont viables. Ceci suggère que les membres de cette famille sont capables de compenser fonctionnellement les uns les autres *in vivo*.

1.5.2.1.2 Intégrateurs de signaux intracellulaires

De plus en plus d'évidences suggèrent que les SRCs sont des co-activateurs impliqués dans de multiples voies de régulation intracellulaires en pouvant moduler l'activité de nombreuses classes de facteurs de transcription. En effet, en plus d'interagir avec plusieurs membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, plusieurs interactions fonctionnelles ont été documentées telles que des interactions avec les facteurs NF- κ B, AP-1, STAT, p53 et E2F1 (Lee *et al.*, 1998; Na *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Arimura *et al.*, 2004; Louie *et al.*, 2004). Par ailleurs, certaines études ont démontré que les SRCs sont des cibles de voies de signalisation distinctes qui peuvent réguler leur activité co-activatrice. Il a été montré que la phosphorylation des SRCs peut être induite par une variété des signaux extracellulaires incluant le facteur de croissance de l'épiderme EGF, les hormones stéroïdiennes, les cytokines et par l'augmentation intracellulaire d'AMPc et que ces événements de phosphorylation sont essentiels pour leur conférer une activité optimale

(Font de and Brown, 2000; Rowan *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004). La phosphorylation permet entre autres de réguler les interactions protéine:protéine avec d'autres co-activateurs et facteurs de transcription tels CPB, p/CAF et NF- κ B. Par ailleurs, des études de phosphorylation de SRC-3 ont montré l'importance des états de phosphorylation de la protéine puisqu'ils déterminent la spécificité d'interaction avec les facteurs de transcription tels ER et NF- κ B. Ces données suggèrent que les SRCs peuvent agir comme intégrateur de différents signaux permettant ainsi à ces signaux d'affecter spécifiquement et précisément un certain nombre de promoteurs et ainsi obtenir une réponse transcriptionnelle adéquate. Dans un cas précis qui nous intéresse au laboratoire et qui sera présenté à la section 1.5.4, les SRCs ont été décrits comme importants dans le mécanisme d'activation de la transcription du gène POMC en réponse au stimulus physiologique CRH.

1.5.3 Les récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille Nur

La sous-famille Nur comprend des régulateurs importants des divers composants de l'axe HPA et exerce un rôle important dans la régulation transcriptionnelle hormonale du gène de la POMC. Cette sous-famille de récepteurs nucléaires compte trois membres, NGFI-B, Nurr1 et NOR-1. NGFI-B, aussi connu sous le nom de Nur77, est le premier membre à avoir été identifié en tant que gène induit par le NGF dans la lignée cellulaire PC12 (Milbrandt, 1988). NOR-1 a été cloné à partir de neurones apoptotiques (Ohkura *et al.*, 1994) et Nurr1 a été caractérisé en tant que facteur de transcription spécifique des neurones dopaminergiques (Law *et al.*, 1992). La structure génomique des membres de la sous-famille est remarquablement similaire, ce qui suggère que ces récepteurs ont évolué à partir d'un gène ancestral commun (Maruyama *et al.*, 1998). Au sein des membres de la sous-famille, le DBD et le LBD sont particulièrement bien conservés, avec une similarité de séquence d'environ 95 % et 60 % respectivement; la portion N-terminale (e.g. AF-1) est cependant divergente (Figure 1.5 B, page 25).

1.5.3.1 Patron d'expression

Les membres de la sous-famille Nur sont hautement exprimés dans le système nerveux chez l'adulte. Ces gènes sont induits en tant que réponse précoce immédiate en réponse à plusieurs stimuli tels les facteurs de croissance et la dépolarisation de la membrane cellulaire (Hazel *et al.*, 1988; Watson and Milbrandt, 1990; Williams and Lau,

1993). En plus d'être exprimés dans diverses régions du cerveau, les Nurs sont exprimés dans des tissus périphériques. NGFI-B est exprimé dans les surrénales, la thyroïde, l'hypophyse, le foie, les testicules, les ovaires, le thymus, les muscles, les poumons et la prostate (Ryseck *et al.*, 1989; Nakai *et al.*, 1990; Bandoh *et al.*, 1997). Nurr1 est exprimé dans le foie, l'hypophyse, le thymus et les ostéoblastes (Mages *et al.*, 1994; Bandoh *et al.*, 1997). NOR-1 est exprimé dans l'hypophyse, les surrénales, le cœur, le muscle squelettique, le thymus, les reins et les glandes submandibulaires (Maruyama *et al.*, 1997).

1.5.3.2 Propriétés de liaison à l'ADN

Les facteurs Nur peuvent lier l'ADN en monomère, en homodimère et en hétérodimère. NGFI-B est le premier récepteur nucléaire à avoir été montré comme pouvant lier l'ADN et activer la transcription en tant que monomère via le site NBRE (Wilson *et al.*, 1991). Ce site correspond à un octanucléotide AAAGGTCA. Un site de liaison pour des homodimères de NGFI-B a été observé dans la partie distale du promoteur du gène POMC (Philips *et al.*, 1997a). Ce site NurRE correspond à une répétition inversée de deux octanucléotides NBRE modifiés et séparés par six paires de bases. Par ailleurs, des hétérodimères au sein des membres de la famille peuvent aussi se former sur ce site NurRE (Maira *et al.*, 1999). NGFI-B et Nurr1 mais pas NOR-1 peuvent hétérodimériser avec RXR et lier l'élément de réponse DR5, constitué de deux répétitions directes du site consensus des récepteurs nucléaires séparées par cinq nucléotides. Dans ce cas, l'activation transcriptionnelle dépend de l'acide rétinoïque 9-*cis* (Perlmann and Jansson, 1995; Zetterstrom *et al.*, 1996).

1.5.3.3 Domaines fonctionnels

La structure du LBD de Nurr1 a été étudiée par cristallographie aux rayons X et elle révèle qu'elle ne contient pas de cavité pour la liaison d'un ligand. Au contraire, plusieurs résidus hydrophobiques encombrants occupent la place disponible pour la liaison d'un ligand potentiel et ceux-ci sont conservés parmi les membres de la famille. Ainsi, l'absence de cavité pour la liaison d'un ligand est prédite pour tous les membres de la famille suggérant que ces récepteurs nucléaires soient ligand indépendants (Wang *et al.*, 2003).

Le domaine AF-1 de NGFI-B joue un rôle crucial dans son activité de *trans*-activation. Contrairement au LBD qui ne semble pas contenir de domaine d'activation

intrinsèque, l'AF-1 de NGFI-B est important pour le rehaussement de son activité transcriptionnelle via le recrutement par interactions directes de co-activateurs tels SRC-2, p300 et pCAF. En hétérodimère avec RXR, l'AF-1 de NGFI-B est également important pour son activité *trans*-activatrice. En effet, le domaine AF-1 peut en lui-même activer la transcription en synergie avec RXR γ en présence de l'acide rétinoïque 9-*cis* (Wansa *et al.*, 2002). Comme attendu, ce domaine permet d'activer la transcription en réponse à un stimulus telle la CRH via la voie de signalisation PKA (Maira *et al.*, 2003c).

1.5.3.4 Régulation des facteurs par phosphorylation

Les récepteurs nucléaires orphelins de la sous-famille Nur activent la transcription en absence de ligand (Paulsen *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1993). Leur activité semble plutôt être régulée par des stimuli extracellulaires qui modulent leurs modifications post-traductionnelles et déterminent leurs niveaux d'expression relatifs. Ces modifications post-traductionnelles telle la phosphorylation sont impliquées dans la localisation nucléaire, l'affinité de liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle des facteurs Nurs. NGFI-B est une cible de plusieurs kinases incluant Akt, ERK2, pp90^{rsk} et « c-jun N-terminal kinase » (Davis *et al.*, 1993; Masuyama *et al.*, 2001; Pekarsky *et al.*, 2001; Slagsvold *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs de ces études visant à connaître les kinases capables de phosphoryler NGFI-B ont été réalisées *in vitro* et la signification biologique de ces phosphorylations demeure largement inconnue. L'événement de phosphorylation le mieux caractérisé est la phosphorylation de la Ser-316 dans le DBD de NGFI-B qui diminue son affinité de liaison à l'ADN et par conséquent son activité (Hirata *et al.*, 1993). En plus d'être impliquée dans la stéroïdogénèse (voir section 1.5.3.5.1), la phosphorylation de la Ser-316 par Akt inhibe les effets pro-apoptotiques de NGFI-B dans les fibroblastes et les lymphocytes T (Masuyama *et al.*, 2001). D'autre part, il y a le NGF qui induit la phosphorylation de la Ser-105 de NGFI-B via la voie des MAPK, ce qui permet l'exportation du complexe NGFI-B:RXR du noyau vers le cytoplasme (Katagiri *et al.*, 2000).

1.5.3.5 Rôles physiologiques

1.5.3.5.1 Implication dans la stéroïdogénèse

Le sous-groupe Nur participe à la stéroïdogénèse, un processus essentiel de l'axe HPA. Dans le cortex surrénalien, la 21 α -hydroxylase est une enzyme limitante dans la

stéroïdogénèse et elle est uniquement exprimée dans les corticosurrénales où elle joue un rôle essentiel dans la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. L'expression de cette enzyme est régulée principalement par l'ACTH. Des études réalisées dans la lignée cellulaire Y1, un modèle d'étude de la fonction corticosurrénale, ont montré que NGFI-B régule le promoteur du gène de la 21 α -hydroxylase via un site NBRE caractérisé (Wilson *et al.*, 1993). Cette régulation dépend de l'ACTH qui induit d'une part l'expression du gène NGFI-B et d'autre part une hypophosphorylation à sa Ser-316 afin d'augmenter son affinité de liaison à l'ADN (Davis and Lau, 1994). Dans les surrénales et les cellules Leydig, NGFI-B active également le promoteur du gène codant pour l'enzyme 3 β -HSD2, la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase isomérase de type 2, une enzyme qui catalyse une étape primaire et essentielle dans la biosynthèse de toutes les classes des hormones stéroïdes (Bassett *et al.*, 2004; Martin and Tremblay, 2005).

1.5.3.5.2 Des régulateurs de l'axe HPA *in vivo* ?

Malgré l'implication de NGFI-B dans la régulation transcriptionnelle de l'axe HPA à plusieurs niveaux, les souris NGFI-B $^{-/-}$ démontrent une régulation normale hypothalamique et hypophysaire de l'axe, de même qu'une stéroïdogénèse normale (Crawford *et al.*, 1995). Ceci suggère qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les facteurs Nur dans la régulation de l'axe corticotrope. Cette hypothèse est soutenue par le fait que Nurr1 et NOR-1 ont été montré comme étant impliqués à plusieurs niveaux de l'axe HPA (Maira *et al.*, 1999; Fernandez *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2001).

1.5.3.5.3 Implication dans l'apoptose

NGFI-B fait partie des acteurs cruciaux dans le processus de la mort cellulaire programmée des cellules T et B (Liu *et al.*, 1994; Woronicz *et al.*, 1994). Le ciblage à la mitochondrie de NGFI-B est requis pour induire l'apoptose (Li *et al.*, 2000). NGFI-B participe également au mécanisme de l'apoptose des macrophages (Kim *et al.*, 2003). Les trois membres de la sous-famille démontrent de la redondance fonctionnelle dans la mort cellulaire programmée. En effet, l'inactivation génique de NGFI-B chez la souris n'abroge pas le mécanisme de sélection négative, suggérant que la présence de Nurr1 et/ou NOR-1 est suffisante pour compenser la perte de NGFI-B (Lee *et al.*, 1995b). En effet, NGFI-B et NOR-1 démontrent une redondance fonctionnelle dans l'apoptose des cellules T (Cheng *et*

et al., 1997). Par ailleurs, une surexpression de NGFI-B ou NOR-1 ciblée dans les cellules T en développement de souris transgéniques entraîne une apoptose des thymocytes et une réduction des niveaux périphériques de cellules T (Woronicz *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1997). Enfin, NOR-1 est impliqué dans l'apoptose des cellules neurales et cancéreuses (Cheng *et al.*, 1997). NGFI-B interagit également avec des régulateurs clefs des processus de mort cellulaire et d'apoptose. La phosphorylation de la Ser-350 par Akt inhibe la mort cellulaire des cellules T en abrogeant sa capacité de liaison à l'ADN et en favorisant son interaction avec 14-3-3 (Masuyama *et al.*, 2001). Dans les cellules de carcinomes, la translocation de NGFI-B du noyau au cytoplasme permet le recrutement de Bax à la mitochondrie (Wilson *et al.*, 2003). Enfin, NGFI-B peut interagir avec le facteur anti-apoptotique Bcl-2 et ainsi induire un changement conformationnel qui expose son domaine BH3, convertissant ainsi Bcl-2 en un facteur pro-apoptotique (Lin *et al.*, 2004).

1.5.3.5.5 Autres fonctions biologiques

La sous-famille Nur représente les médiateurs de l'action de l'AMPC dans le contrôle hormonal de la gluconéogenèse. L'expression hépatique de ces facteurs est induite en condition de jeûne et en réponse au glucagon *in vivo* et ceux-ci régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse et le transport du glucose dans le foie. Un fait intéressant est que l'expression de ces facteurs est augmentée dans les modèles murins de diabète et par le fait même contribue à l'hyperglycémie (Pei *et al.*, 2006).

Dans un autre ordre d'idées, Nurr1 joue un rôle essentiel dans l'activation transcriptionnelle de la tyrosine hydroxylase, une enzyme impliquée dans la synthèse de la dopamine et est essentiel pour le développement des neurones dopaminergiques (Zetterstrom *et al.*, 1997; Sakurada *et al.*, 1999). Des mutations dans Nurr1 ont été associées à la maladie de Parkinson (Le *et al.*, 2003). Les souris Nurr1^{-/-} meurent à la naissance dû à un dysfonctionnement respiratoire (Castillo *et al.*, 1998; Nsegbe *et al.*, 2004). Les souris NOR-1^{-/-} ont des défauts dans les canaux semi-circulaires de l'oreille interne (Ponnio *et al.*, 2002). Elles ont aussi un défaut développemental post-natal de l'hippocampe, une guidance axonale perturbée et subissent une perte des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Ponnio and Conneely, 2004).

1.5.4 Activation transcriptionnelle du gène POMC par la CRH

L'activateur physiologique de la transcription du gène POMC est la CRH. La liaison

du CRH à son récepteur conduit à une activation de l'adénylate cyclase, une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc suivi d'une activation de la protéine kinase A (PKA). Il en découle une stimulation du taux de transcription du gène POMC dans les cellules corticotropes (Gagner and Drouin, 1987), qui se traduit concrètement par une augmentation de la concentration intracellulaire en ARNm. Cette action de la CRH ne requiert pas la synthèse protéique *de novo* puisqu'un traitement à la cycloheximide n'influence aucunement son effet.

1.5.4.1 Voies de signalisation

Deux cascades de signalisation découlent de l'activation de la PKA par la CRH et l'AMPc. La première dépend de l'entrée de calcium par les canaux voltage dépendant de type L (Luini *et al.*, 1985; Lee and Tse, 1997) au niveau de la membrane plasmique et requiert l'activité de la calmoduline kinase II (Kovalovsky *et al.*, 2002). La seconde ne dépend pas du calcium et est couplée en partie à la voie MAPK. La voie MAPK est aussi activée par la CRH et l'AMPc et implique la cascade de signalisation Rap1, B-Raf, MEK et ERK1/2. Cette voie est à la fois sous le contrôle des mécanismes dépendant et indépendant de l'entrée de calcium dans la cellule corticotrope mais nécessite l'activation de la PKA. Par ailleurs, la présence de B-Raf dans les corticotropes est essentielle pour le couplage de l'augmentation en AMPc à l'activation des MAPK (Vossler *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 2000). Ces voies de signalisation induites par la CRH régulent l'expression du gène POMC par au moins deux mécanismes. Tout d'abord, il y a une induction des gènes de la sous-famille Nur indépendamment de l'activité des MAPK. L'implication des MAPK se fait plutôt au niveau de la stimulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs Nurs par plusieurs événements de phosphorylation (Kovalovsky *et al.*, 2002).

1.5.4.2 Identification des séquences régulatrices et des facteurs de transcription

Le mécanisme par lequel la CRH agit sur la transcription du gène POMC a été étudié de manière à identifier les éléments au promoteur qui y contribuent ainsi que les facteurs s'y liant. Différents éléments et acteurs ont été décrits. Un premier élément en position -141/-106 a été identifié comme conférant une réponse à une stimulation CRH. Cet élément est composé de deux sites adjacents, soient un site TRE-like suivi d'une séquence consensus pour AP-2. Cependant, cet élément ne confère aucune réponse à une activation

de la voie PKA, soit par une stimulation avec la forskoline ou en présence de la sous-unité catalytique de la PKA (Bishop and Mouradian, 1993). Cette donnée suggère que le mécanisme d'action de la CRH sur la transcription du gène POMC nécessite d'autres cascades de signalisation en plus des voies dépendantes de l'AMPc.

Les propriétés de liaison du facteur PCRH-REB-1 ont été décrites par des expériences *in vitro* qui décrivent ce facteur comme liant un élément du promoteur conférant une réponse au CRH en position -171/-160. Cependant, ce facteur reste encore un acteur potentiel dans le mécanisme d'action de la CRH puisque son rôle n'a pas été précisé (Jin *et al.*, 1994).

Le facteur AP-1 semble lui aussi participer à l'induction de la transcription par la CRH mais les détails du mécanisme sont inconnus. Un site AP-1 au niveau de l'exon 1 a été décrit dans le promoteur du gène POMC (Therrien and Drouin, 1991). Une stimulation CRH conduit à une induction du gène *c-fos* dans les cellules AtT-20. Ce facteur est un activateur de la transcription du gène POMC via son site AP-1. Cependant, la délétion du site AP-1 réduit de façon considérable l'activité activatrice de *c-fos* sans toutefois affecter la réponse au CRH du promoteur. Ces données suggèrent qu'il existe d'autres mécanismes par lesquels la CRH active la transcription du gène POMC (Boutillier *et al.*, 1991; Boutillier *et al.*, 1995).

L'analyse de la région distale du promoteur qui confère une grande réponse à la signalisation CRH a permis d'identifier un site de liaison pour les membres de la sous-famille Nur, le NurRE en position -404/-383 (Philips *et al.*, 1997a). Ce site est un palindrome lié par un dimère des facteurs Nurs et il confère une grande sensibilité aux signaux induits par la CRH contrairement au site NBRE en position -63. Le NurRE peut lier préférentiellement un homodimère de NGFI-B mais aussi un hétérodimère constitué des divers membres de la sous-famille (Maira *et al.*, 1999). Toutefois, il semble que l'hétérodimère doit contenir une molécule de NGFI-B pour une liaison efficace à ce site, ce qui suggère qu'il existe une spécificité de liaison à l'ADN au sein des membres de la sous-famille.

1.5.4.3 Mécanismes d'activation par les facteurs Nurs

Dans les cellules AtT-20, la CRH stimule l'expression des facteurs Nurs (Murphy and Conneely, 1997; Philips *et al.*, 1997a; Maira *et al.*, 1999). Cependant, l'activation transcriptionnelle ne requiert pas cette augmentation. Comme mentionné précédemment, la cascade de signalisation induite par la CRH comprend l'activation de la protéine kinase A (PKA) et la voie des MAP kinases. Ces signaux stimulent la formation et la liaison d'un dimère des facteurs Nur au niveau du site NurRE du promoteur du gène POMC (Figure 1.6, page 38). La signalisation favorise par le fait même la déphosphorylation de la sérine 316 du domaine de liaison à l'ADN de NGFI-B qui est requise pour sa liaison à l'ADN. Ces signaux augmentent également l'activité transcriptionnelle du domaine AF-1 de NGFI-B via le recrutement des co-activateurs SRC-2 (TIF2) (Maira *et al.*, 2003b) et Rb (Batsche *et al.*, 2005a). Rb n'est pas requis pour le recrutement de SRC-2 au domaine AF-1 de NGFI-B mais il potentialise l'action co-activatrice de SRC-2 via des interactions protéine:protéine directes avec NGFI-B et SRC-2.

1.5.4.4 Activation par le facteur Tpit

L'élément régulateur Tpit/PitxRE répond aussi à une stimulation CRH via les voies AMPc/PKA et MAPK. La CRH module l'activité du facteur Tpit possiblement par le recrutement des co-activateurs de la famille SRC/p160 (Maira *et al.*, 2003a). En effet, une stimulation de la voie PKA rehausse spécifiquement l'activité transcriptionnelle de Tpit qui est SRC-2 dépendante. SRC-2 représente donc un acteur clef dans l'activation de la transcription par la CRH dont les points d'ancrage facilitant son recrutement au promoteur sont les facteurs NGFI-B et Tpit (Figure 1.6, page 38).

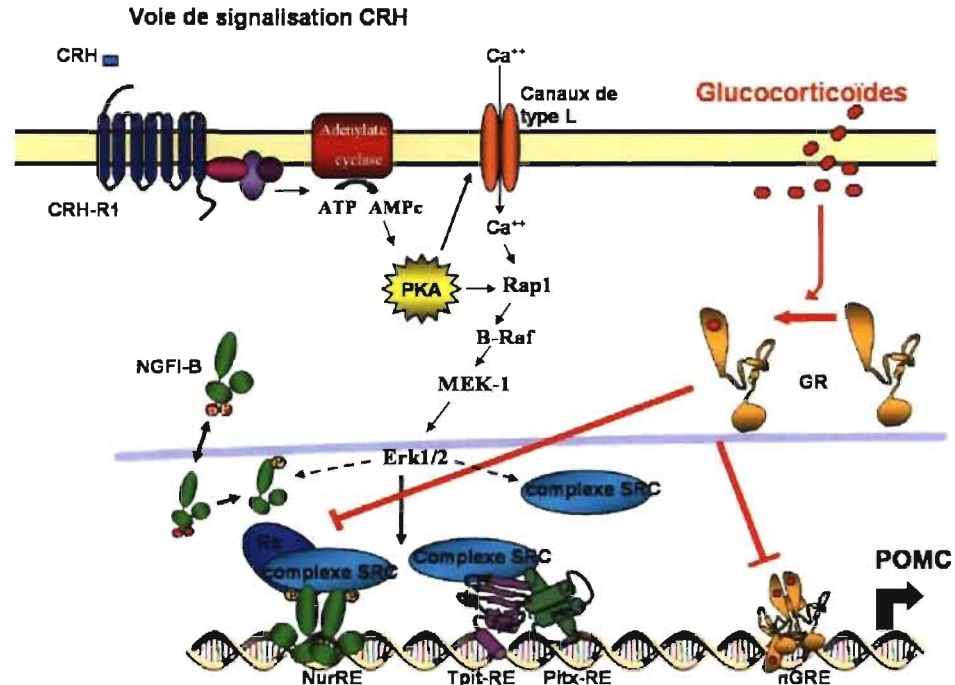


Figure 1.6 : Régulation hormonale de la transcription du gène POMC au sein de l'axe HPA. La liaison du CRH à son récepteur CRHR-1 active une cascade de signalisation qui dépend de l'activation de la PKA. Cette cascade nécessite l'accumulation d'AMPc accompagnée de l'entrée de calcium (Ca^{2+}). Cette voie de signalisation cible les dimères de facteurs Nur liant le NurRE, Tpit et potentiellement le complexe co-activateurs incluant les membres de la famille SRC/p160 pour activer la transcription. Par opposition, les glucocorticoïdes inhibe la transcription en liant le nGRE et par *trans*-répression de l'activité des facteurs Nur au NurRE.

1.5.5 Répression transcriptionnelle du gène POMC par les glucocorticoïdes

L'ACTH représente le stimulus majeur de la synthèse des glucocorticoïdes par les surrénales. Le maintien d'un niveau physiologique en glucocorticoïdes requiert une rétroinhibition adéquate sur la transcription du gène POMC et sur la sécrétion d'ACTH hypophysaire. Une dérégulation de cette boucle de rétroinhibition résulte dans la plupart des cas en des conséquences métaboliques sévères qui se caractérisent par la maladie de Cushing. Les glucocorticoïdes exercent aussi une rétroinhibition sur les neurones de l'hypothalamus exprimant la CRH et sur les corticotropes.

Deux mécanismes de répression transcriptionnelle du gène POMC par les glucocorticoïdes ont été décrits (Figure 1.6, page 38). Il y a d'une part la répression directe

qui dépend de la liaison de molécules GR au promoteur. Un site nGRE qui permet la liaison de trois molécules de GR a été défini dans le promoteur du gène POMC de rat en position -63 et a été montré comme important pour la répression par les glucocorticoïdes dans les cellules AtT-20 (Drouin *et al.*, 1989b) et en souris transgéniques (Tremblay *et al.*, 1988). Le nGRE chevauche un site de liaison pour les facteurs Nur, le NBRE. La mécanistique de la répression par le complexe trimérique de GR recruté au nGRE pourrait impliquer le déplacement d'un activateur transcriptionnel tel un facteur Nur présent au site NBRE du promoteur et/ou un recrutement de corépresseurs transcriptionnels. Les souris transgéniques dim, dans lesquelles le gène GR a été remplacé par un mutant de GR empêchant sa dimérisation, présentent une déficience dans la rétroinhibition hypophysaire de la transcription du gène POMC par les glucocorticoïdes. Ainsi, ce résultat suggère que le nGRE est une cible potentielle pour la répression dépendante de la dimérisation de GR (Reichardt *et al.*, 1998). D'autre part, la rétroinhibition par les glucocorticoïdes dépend aussi de la *trans*-répression exercée par GR sur l'activité des récepteurs nucléaires orphelins de la famille NGFI-B au site NurRE du promoteur (Philips *et al.*, 1997b). Cette *trans*-répression dépend d'une interaction directe protéine:protéine entre GR et les facteurs Nurs qui sont co-recrutés au promoteur du gène POMC sous stimulation hormonale (Martens *et al.*, 2005). De plus, elle requiert la protéine Brg-1 du complexe Swi/Snf ainsi que son activité ATPase. Brg-1 est recruté constitutivement au promoteur et permet la formation d'un complexe stable *in vivo* entre GR et NGFI-B, de même qu'entre GR et HDAC2. Le recrutement au promoteur de HDAC2 dépend d'une stimulation par les glucocorticoïdes et entraîne la désacétylation de l'histone H4 au locus *POMC*. Ainsi, l'assemblage de ces complexes protéiques au promoteur, initié par une interaction directe entre NGFI-B et GR, et la désacétylation des histones contribuent collectivement à la *trans*-répression (Bilodeau *et al.*, 2006).

1.6 La famille de co-régulateurs TIF1

La famille TIF1 représente une famille de co-régulateurs transcriptionnels grandissante en terme de fonctions biologiques. En effet, de plus en plus d'évidences suggèrent que les membres de la famille TIF1 sont des régulateurs clefs de processus physiologiques chez les mammifères tels la croissance cellulaire, la différenciation et le développement. Cette famille inclut un seul membre chez la drosophile, Bonus, et quatre

membres chez les mammifères, soient TIF1alpha, TIF1beta, TIF1delta et TIF1gamma. Structuellement, les membres de la famille TIF1 contiennent plusieurs domaines fonctionnels conservés (Le *et al.*, 1995; Le *et al.*, 1996): un motif RBCC en N-terminal composé d'un doigt RING, de deux boîtes B et d'un domaine coiled coil; un domaine central faiblement conservé; et une région à l'extrémité C-terminale comprenant un motif à doigt PHD, spécialisé dans la reconnaissance de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Pena *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006), suivi d'un bromodomaine qui reconnaît les lysines acétylées des histones H3 et H4 (Dhalluin *et al.*, 1999) (Figure 1.7, page 40). Ces deux derniers motifs sont retrouvés principalement chez les corégulateurs transcriptionnels agissant au niveau de la chromatine (Jeanmougin *et al.*, 1997). Enfin, tous les membres de cette famille ont une capacité de répression transcriptionnelle intrinsèque lorsque fusionnés à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue (Le *et al.*, 1996; Venturini *et al.*, 1999; Khetchoumian *et al.*, 2004). Cette section portera sur les principales fonctions biologiques de ces facteurs, plus particulièrement sur TIF1 α qui est impliqué dans la régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires, et sur TIF1 β qui fera l'objet de mes travaux de recherche.

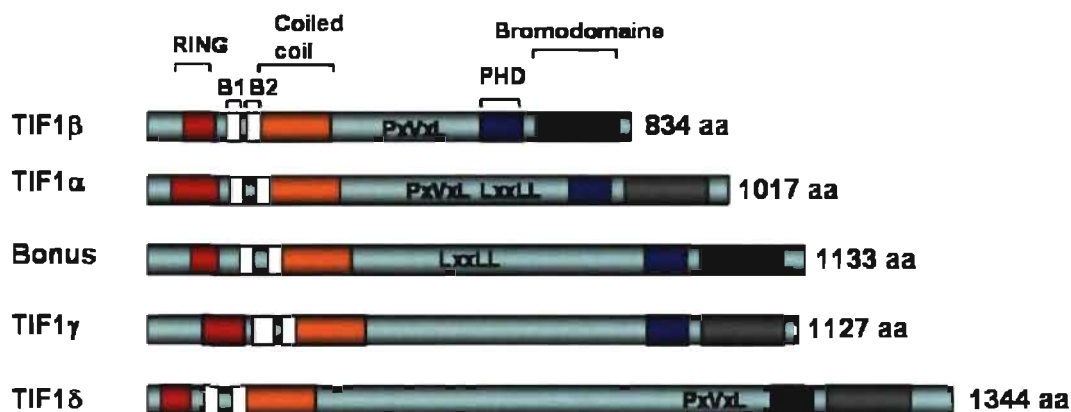


Figure 1.7 : Structure des membres de la famille TIF1. TIF1 α , TIF1 β et TIF1 δ contiennent le motif conservé de liaison aux protéines HP1, PxxVxL. Le motif LxxLL se retrouve uniquement chez TIF1 α et son homologue Bonus de la drosophile.

1.6.1 TIF1 α

TIF1 α est le membre fondateur de cette famille. Il a été identifié par criblage

généétique chez la levure par sa capacité de rehausser l'activité transcriptionnelle du domaine AF-2 du récepteur nucléaire RXR (Le *et al.*, 1995). Il présente un patron d'expression ubiquitaire et précoce au cours du développement de la souris (Remboutsika *et al.*, 1999) qui est maintenu dans les tissus adultes (Le *et al.*, 1995) et il s'associe à l'euchromatine, préférentiellement aux sites de transcription de l'ARN polymérase II (Remboutsika *et al.*, 1999). En système double hybride, TIF1 α a été montré comme interagissant de façon ligand dépendante avec quatre autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires via un motif LXXLL, caractéristique des co-activateurs de récepteurs nucléaires : le récepteur de la vitamine D3 VDR, le récepteur des oestrogènes ER, le récepteur de la progestérone PR et le récepteur de l'acide rétinoïque RARalpha (Le *et al.*, 1995; Le *et al.*, 1996). Cette interaction induit une hyperphosphorylation (Fraser *et al.*, 1998) de TIF1 α de façon ligand dépendante. Il est capable d'autophosphorylation et de phosphoryler certains composants de la machinerie transcriptionnelle de base qui sont TFIIE α , TAFII28 et TAFII55 *in vitro* ainsi que les membres de la famille HP1 (Fraser *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999). TIF1 α est le seul membre de la famille connu comme interagissant avec les récepteurs nucléaires jusqu'à présent. Des données publiées récemment ont suggéré une explication moléculaire quant au mode d'action de TIF1 α dans la co-activation des récepteurs nucléaires. En transfection transitoire, cette co-activation semble reposer sur une coopération entre les protéines d'un complexe tertiaire stable qui comprend TIF1 α et les protéines CARM1 et SRC-2 (Teyssier *et al.*, 2006).

Lorsque fusionné à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, TIF1 α possède une activité transcriptionnelle intrinsèque répressive et cette activité requiert la désacétylation des histones (Le *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1999). Il a été montré que TIF1 α interagit directement avec les membres de la famille hétérochromatine protéine 1 (HP1) *in vitro*, une classe de protéines non histoniques qui impose un silence transcriptionnel aux gènes via le maintien de l'hétérochromatine. Cette interaction dépend d'un motif, PXVXL, localisé dans sa région centrale qui lie directement le domaine « chromoshadow » de HP1 (Le *et al.*, 1996). En somme, ces résultats suggèrent que TIF1 α possède un double rôle dans la transcription, c'est-à-dire qu'il peut agir à la fois dans l'activation hormono-dépendante et la répression via la formation d'hétérochromatine transcriptionnellement inactive.

Le gène TIF1 α est également impliqué dans des translocations chromosomiques. Une portion de la région N-terminale de TIF1 α est fusionnée à une région tronquée de la protéine B-raf pour former l'oncoprotéine T18 de la souris (Le *et al.*, 1995). Cette protéine encode un domaine sérine/thréonine kinase avec un potentiel oncogénique qui est retrouvé dans des carcinomes hépatocellulaires de souris (Klugbauer and Rabes, 1999). Supportant le potentiel oncogénique de la protéine T18, Zhong et al ont montré que TIF1 α et PML sont des suppresseurs de tumeurs requis pour l'action inhibitrice de RA sur la croissance cellulaire (Zhong *et al.*, 1999). Au niveau du mécanisme transcriptionnel, l'étude révèle que PML, TIF1 α et l'hétérodimère RXR α /RAR α agissaient ensemble dans un complexe transcriptionnel pour activer des gènes impliqués dans l'inhibition de la croissance cellulaire et dans la différenciation. Pour promouvoir l'oncogenèse et conférer un avantage prolifératif aux cellules, l'oncoprotéine T18 (TIF1 α -B-raf) et PML-RAR α agissent comme dominants négatifs sur ce complexe transcriptionnel. TIF1 α et TIF1 γ peuvent aussi se fusionner au domaine tyrosine kinase du récepteur RET dans les carcinomes papillaires humains de la thyroïde par réarrangements chromosomiques, PTC6 et PTC7 respectivement (Klugbauer *et al.*, 1999).

1.6.2 Bonus

Bonus, l'homologue de TIF1 α chez la drosophile, interagit également avec des récepteurs nucléaires (Beckstead *et al.*, 2001). Cette interaction nécessite l'intégrité du domaine d'activation de l'AF-2 et elle requiert le motif LXXLL. Bonus est requis pour la viabilité cellulaire. Il joue un rôle essentiel dans le développement de plusieurs organes et tissus durant l'embryogenèse via la régulation de gènes impliqués dans la réponse à l'ecdysone (Beckstead *et al.*, 2001). Il est connu particulièrement comme interagissant à la fois biochimiquement et génétiquement avec betaFTZ-F1 pour inhiber son activité.

1.6.3 TIF1 β

TIF1 β est exprimé de façon ubiquitaire très tôt au cours du développement de la souris et est maintenu dans plusieurs tissus adultes (Kim *et al.*, 1996; Cammas *et al.*, 2000). Cette protéine a initialement été identifiée comme corépresseur universel de la famille des répresseurs transcriptionnels à doigt de zinc de type Krüppel contenant un domaine KRAB (KRAB-ZFP) (Friedman *et al.*, 1996). En effet, TIF1 β interagit avec plusieurs domaines

KRAB dont ceux de KOX1 (Moosmann *et al.*, 1996) et Kid-1 (Kim *et al.*, 1996); cette interaction est perdue en présence d'un mutant de KRAB-ZFP ayant perdu toute capacité de répression; TIF1 β est capable d'augmenter la répression induite par des KRAB-ZFPs.

Cette répression de la transcription nécessite le motif à doigt PHD et le bromodomaine qui coopèrent dans la répression via le recrutement de protéines ayant diverses activités enzymatiques tels que le complexe de remodelage de la chromatine et de désacétylation NuRD/Mi2-alpha et la protéine SETDB1 qui est impliqué dans la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Schultz *et al.*, 2001;Schultz *et al.*, 2002). Cette activité répressive requiert également la sumoylation de sa région C-terminale pour le recrutement de protéines à activité HDAC (Mascle *et al.*, 2007). Comme TIF1 α , TIF1 β interagit avec les membres de la famille HP1, via le motif PXVXL conservé (Lechner *et al.*, 2000). Ce motif d'interaction est important pour la relocalisation de TIF1 β dans les régions d'hétérochromatine centromérique lors la différenciation cellulaire (Cammass *et al.*, 2002;Cammass *et al.*, 2004;Sripathy *et al.*, 2006) ainsi que pour son activité de co-répression de la transcription des protéines à domaines KRAB (Nielsen *et al.*, 1999;Lechner *et al.*, 2000).

Très peu d'études décrivent la protéine TIF1 β comme co-activateur. Parmi celles-ci, Chang et al ont montré que TIF1beta est un co-activateur de C/EBP β et GR pour l'induction du gène de l' α 1-acide glycoprotéine par les cytokines inflammatoires et les glucocorticoïdes (Chang *et al.*, 1998).

Les fonctions physiologiques de TIF1 β ont été étudiées à l'aide de souris ayant une invalidation génique pour le gène TIF1 β . Cette invalidation génique engendre un phénotype embryonnaire léthal. Le développement embryonnaire est normal jusqu'au stade du blastocyte, l'implantation se fait correctement mais il y a un défaut de gastrulation suggérant un rôle essentiel pour le développement précoce embryonnaire post-implantatoire (Cammass *et al.*, 2000). Cette donnée suggère également que les membres de la famille exercent des fonctions distinctes malgré leur similitude structurelle.

1.6.4 TIF1 γ

TIF1 γ a été cloné dans un criblage par hybridation de faible stringence en utilisant TIF1 α comme sonde (Venturini *et al.*, 1999). Tout comme TIF1 α et TIF1 β , TIF1 γ présente un patron d'expression ubiquitaire au cours du développement et possède une fonction intrinsèque répressive. Chez le poisson zèbre, une mutation dans le gène TIF1 γ cause des défauts dans les processus d'hématopoïèse embryonnaire primitive et adulte définitive. Il en résulte une perte d'expression de certains facteurs de transcription hématopoïétiques et par le fait même une perte sévère de cellules érythroïdes. TIF1 γ est donc un régulateur essentiel de l'hématopoïèse chez le poisson zèbre (Ransom *et al.*, 2004).

La capacité d'oligomérisation a été étudiée au sein des membres de la famille. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que TIF1 α et TIF1 γ sont capable d'homo- et d'hétéro-oligomériser efficacement. TIF1 β peut homo-oligomériser mais est incapable d'hétéro-oligomérisation avec les autres membres (Peng *et al.*, 2002). *In vivo*, des expériences d'interactions protéine:protéine par la technique BRET ont cependant démontré que TIF1 α et TIF1 β sont capable d'homo- et d'hétéro-oligomériser dans des cellules mammifères (Germain-Desprez *et al.*, 2003).

La signification de cette propriété a été étudiée à l'aide de gène rapporteur. En transfection transitoire, lorsque TIF1 γ et TIF1 α sont co-exprimés, TIF1 γ dé-réprime l'activité répressive de TIF1 α , et ce de façon dose dépendante. Cette dé-répression est dépendante de la capacité d'hétéro-oligomérisation entre les protéines (Peng *et al.*, 2002). Par ailleurs, des expériences de BRET ont montré l'existence d'un complexe tertiaire composé du facteur de transcription à domaine KRAB ZNF74, de TIF1 α et TIF1 β (Germain-Desprez *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que l'hétéro-oligomérisation entre les membres de la famille TIF1 peut représenter un mécanisme de régulation biologique *in vivo*.

1.6.5 TIF1 δ

TIF1 δ a été identifié par similarité avec TIF1 α par des recherches bioinformatiques dans les banques de données GeneBank et dbEST (Khetchoumian *et al.*, 2004). Il diffère des autres membres par son patron d'expression qui est restreint aux testicules et s'associe préférentiellement avec l'isotype gamma de la protéine HP1. Il est suggéré que TIF1 δ

pourrait agir comme un régulateur négatif des gènes post-méiotiques dans les cellules germinales (Khetchoumian *et al.*, 2004).

1.7 Objectifs de travail

Comme il a été mentionné plus tôt, la CRH est un des régulateurs physiologiques importants pour la fonction des cellules corticotropes. La CRH agit d'une part sur la sécrétion d'ACTH et d'autre part sur la transcription du gène POMC. Les mécanismes qui décrivent l'action de la CRH sur l'activation de la transcription du gène POMC ne sont que partiellement définis. L'élément NurRE du promoteur du gène POMC qui est lié par les facteurs Nur confère une importante réponse transcriptionnelle à la CRH. De plus, contrairement aux autres éléments régulateurs décrits dans le promoteur du gène POMC, le NurRE représente un point de contrôle clef de la régulation transcriptionnelle hormonale. En effet, il est soumis à une régulation positive par la CRH et négative par les glucocorticoïdes. Les facteurs Nur sont donc des acteurs cruciaux dans cette régulation puisqu'ils participent à cette double régulation. Leur implication dans ces mécanismes transcriptionnels se fait principalement via des interactions protéine:protéine décrites au laboratoire.

Mon projet vise l'étude des mécanismes d'activation de la transcription du gène POMC par la CRH impliquant NGFI-B. Le premier objectif de mon projet consiste en l'identification de protéines régulatrices s'associant à NGFI-B et participant à la régulation hormonale de la transcription de POMC. Pour y parvenir, nous avons choisi une approche protéomique qui consiste en la purification de NGFI-B par affinité à partir d'extraits nucléaires de cellules AtT-20, notre modèle de corticotropes. Cette approche a comme second objectif de caractériser le mécanisme d'action des protéines dont la fonction se situe au niveau de l'activation transcriptionnelle par la CRH. Ce projet permettra entre autres d'identifier de nouveaux co-régulateurs transcriptionnels de NGFI-B, de comprendre la régulation dynamique à laquelle est soumise la transcription du gène POMC via le facteur NGFI-B en présence des signaux CRH et d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans ce mécanisme.

1.8 Contribution et accord des coauteurs

Article #1 : *TIF1 β /KAP-1 is a novel coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77 and participates in Nur-dependent hormone responsiveness*

J'ai réalisé toutes les figures de l'article (Fig. 1 à 6) sauf la figure 4E qui a été réalisée par Juliette Rambaud. La figure 4E est une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrant le recrutement de TIF1 β au promoteur du gène POMC en condition CRH et Dex/CRH.

J'ai également écrit le manuscrit sous la supervision du Dr Aurélio Balsalobre et du directeur de laboratoire Jacques Drouin.

CHAPITRE 2

ARTICLE

TIF1 β /KAP-1 is a novel coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77 and participates in Nur-dependent hormone responsiveness

Short title: TIF1 β enhances NGFI-B-dependent transcription

Julien Desroches, Juliette Rambaud, Aurélio Balsalobre and Jacques Drouin*

*Corresponding author :

Dr Jacques Drouin

Laboratoire de génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110 des Pins Ouest

Montréal QC, Canada, H2W 1R7

Tel : 514-987-5680 / Fax : 514-987-5575



2.1 Abstract

The orphan nuclear receptor NGFI-B represents an important mediator of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) action on POMC transcription. In order to define the molecular mechanisms underlying CRH activation of POMC transcription, we investigated NGFI-B associated proteins and identified the regulatory protein TIF1 β by mass spectrometry. TIF1 β is a transcriptional intermediary factor that functions as a corepressor for KRAB domain-containing zinc finger transcription factors. The transcriptional repression and silencing activity of TIF1 β involve formation and maintenance of heterochromatin structures. Here, we report that TIF1 β is a coactivator of NGFI-B. Indeed, TIF1 β interacts with NGFI-B and enhances transcription mediated through the NurRE regulatory element of the POMC promoter. Following CRH stimulation, TIF1 β is recruited to the POMC promoter and TIF1 β potentiates CRH and PKA signaling through the NurRE. TIF1 β preferentially activates NGFI-B/Nur77 activity compared to the related factors Nur1 and NOR-1. We have previously shown that CRH activation of NGFI-B activity involves recruitment of the coactivator SRC-2, and we now show that TIF1 β synergizes with SRC-2 to enhance NGFI-B activity. Thus, TIF1 β is an important coactivator of NGFI-B-dependent transcription and of CRH signaling in the pituitary.

2.2 Introduction

Transcriptional regulation by members of the nuclear receptor (NR) superfamily relies on coregulatory proteins that are part of multiprotein complexes and act through different transcriptional steps including the initiation phase (1-5). Many proteins that share similar functional properties, namely coactivators or corepressors, diverge structurally and in the way they regulate transcription through different enzymatic activities. For example, when recruited by NR, these coregulators may lead to remodeling of chromatin structure or to recruitment of the basal transcriptional machinery (6). Among these coregulatory proteins, the transcriptional intermediary factors (TIFs) are part of a growing family of transcriptional coregulators that are involved in several developmental and physiological processes (7-11). The TIF1 family includes TIF1 α (12), TIF1 β (10), TIF1 δ (9), TIF1 γ (13) and Bonus (7) and are characterized by several conserved motifs : a N-terminal tri-partite motif, the RBCC motif composed of a RING finger, two B-boxes and a coiled-coil domain, and a C-terminal PHD finger followed by a bromo domain. The TIF1 β RBCC motif is sufficient to interact directly with the KRAB domains and is involved in homo- and heterodimerization (14-16). The PHD finger and bromo domain of TIF1 β were shown to be important for recruitment of corepressor complexes and to cooperate for transcriptional repression (17;18). Interestingly, these latter two motifs are mainly found in transcription cofactors and chromatin-remodeling proteins (19;20) and may be important to target proteins to specific chromatin structures (21-23).

TIF1 α is the founding member of the TIF1 family and was identified in a yeast genetic screen as a protein able to increase the transcriptional activity of the retinoid X receptor in a 9cis-RA dependent manner (12). TIF1 α interacts directly with members of the nuclear receptor subfamily including RAR, TR, VDR and ER (10;24). This interaction is ligand-dependent; it occurs through a single LXXLL motif and promotes its hyperphosphorylation *in vivo* (25). Moreover, TIF1 α is a protein kinase that is autophosphorylated and can selectively phosphorylate components of the basal transcription machinery including TFIIIE α , TAFII28 and -55 (25). Supporting its role in transcriptional activation, TIF1 α is a preferential euchromatin-bound protein that colocalizes specifically with RNA polymerase II transcription initiation sites (26) and has been found to form a tertiary protein complex with the NR coactivators GRIP1 and CARM1 which cooperate

synergistically to enhance NR-mediated transcription (27). It also functions as a tumor suppressor with PML and RXR α /RAR α in a transcription complex required for the growth-inhibitory activity of retinoic acid (28).

TIF1 β is a developmental regulatory protein that is essential for early postimplantation mouse development (8) and exerts important functions in spermatogenesis (29). TIF1 β also known as KAP-1 (30) or KRIP-1 (31) is proposed to act as the universal transcriptional corepressor for the KRAB domain-containing zinc finger transcription factors such as KOX1 (32), ZNF133 and ZNF140 (30) and Kid-1 (31), through a conserved interaction between variants of the KRAB domain and TIF1 β (33). Consequently, it represses transcription efficiently when tethered to DNA and enhances KRAB mediated-repression through different mechanisms. First, TIF1 β recruits different enzymatic activities through direct protein: protein interactions including: 1) the nucleosome remodeling and deacetylation complex (NuRD/Mi-2 α) (17) and 2) the histone methyltransferase SETDB1, that specifically methylates Lys 9 of histone H3 (18). TIF1 β is also an intrinsic component of the N-CoR-1 complex containing both HDAC and ATP-dependent Swi/Snf activities (34). Secondly, TIF1 β interacts directly with endogenous members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family (HP1 α , - β and - γ) via the conserved pentapeptide sequence PXVXL, required for transcriptional repression (10;35;36). These data supports a role for TIF1 β in the epigenetic regulation of transcription via the initiation and maintenance of heterochromatin structures. In addition to its corepressor properties, TIF1 β was found to be an important coactivator of C/EBP β and GR for the induction of the α 1-acid glycoprotein gene expression (37).

In this study, we show that TIF1 β is an interacting protein of NGFI-B, a member of the NGFI-B subfamily of orphan nuclear receptors. This distinct subfamily also includes two Nur factors, Nur-related factor 1 (Nurr1) and neuron-derived orphan receptor 1 (NOR-1) (38-40). NGFI-B and NOR-1 are constitutively expressed in some regions of the brain as well as in peripheral tissues. In contrast, the Nurr1 expression pattern is more restricted to the central nervous system (40-42). The Nur factors are immediate early response genes that share a well conserved DNA binding domain (DBD) and ligand binding domain (LBD) but a poorly conserved N-terminal A/B region (43).

Nur subfamily members are important physiological regulators implicated at multiple levels of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis, which manages the stress response via induction of adrenal glucocorticoid synthesis and secretion by corticotroph-producing adenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH is derived from the processing of the proopiomelanocortin (POMC) precursor and it is under the control of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH). At the hypothalamic level, the corticotropin-releasing hormone (CRH)-producing neurons exhibit induced Nur factors after stress (44;45) and these may in turn regulate CRH transcription (46). In the adrenal-derived Y1 cell line, ACTH stimulates NGFI-B expression and activity which leads to an enhancement of 21 α -hydroxylase gene transcription, a rate-limiting enzyme in adrenal steroidogenesis (47;48). It also enhances transcription of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene, an essential enzyme that catalyzes an essential step in the biosynthesis of steroid hormones (49;50). In corticotrophs of the anterior pituitary, the CRH stimulatory effects (51;52) and the glucocorticoid mediated negative feedback of POMC gene transcription (53) involve members of the Nur subfamily (54-56). Nur factors regulate the POMC promoter via two regulatory sites, namely the NBRE site which is bound by a monomer, and the Nur response element (NurRE) site, which can bind homodimeric or heterodimeric complexes containing at least NGFI-B (57). NGFI-B has been shown to be an important mediator of CRH action on POMC transcription through the NurRE (56;58). The NurRE activity is also subject to glucocorticoid *trans*-repression, involving direct protein interactions between NGFI-B, GR and Brg-1 (54;59).

Upon binding to its receptor CRHR-1 on corticotrophs (60), CRH induces a signaling cascade that ultimately leads to increased POMC gene transcription (51;52). CRH increases cyclic AMP (cAMP) levels followed by the activation of the protein kinase A (PKA) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (61-63). The molecular events involved in CRH activation include dephosphorylation of Ser³¹⁶ of NGFI-B which allows subsequent NGFI-B dimer binding to the NurRE with concomitant recruitment of SRC-2 and Rb (58;64). SRC/p160 coactivators enhance transcription in part by their intrinsic histone acetyltransferase activity and by recruitment of CBP/p300 and coactivators that contain other enzymatic activities such as the histone methyltransferase CARM-1 and the SWI/SNF complex subunit BAF57 (65;66).

In order to identify hormone responsive regulators that might be involved in CRH activation and glucocorticoid repression of the POMC transcription through the NurRE site, we proceeded to purification of endogenous NGFI-B-associated proteins in POMC-expressing cells. We report the identification and the characterization of TIF1 β as a novel coactivator of NGFI-B. TIF1 β enhances POMC gene transcription through Nur orphan NR, preferentially NGFI-B. More particularly, TIF1 β is recruited to the POMC promoter under CRH stimulation and it enhances Nur-dependent PKA and CRH responses. Finally, the action of TIF1 β on NGFI-B-dependent transcription may involve synergistic activation with SRC-2.

2.3 Results

2.3.1 Several transcriptional regulatory proteins interact with NGFI-B

An important physiological regulator of corticotroph function is the hypothalamic hormone CRH which stimulates POMC transcription. This transcriptional regulation is mediated by the Nur subfamily of orphan nuclear receptors and involves protein: protein interactions with coregulatory proteins such as SRC-2 and Rb (58;64). Since NGFI-B action may involve other coregulatory proteins in addition to these coactivators, we used gel filtration of AtT-20 nuclear extracts on a Superose 6 column to test whether NGFI-B and Nurr1 are present within high molecular weight protein complexes (Figure 1A). NGFI-B and Nurr1 were detected by Western blot in many fractions ranging in size from ≥ 1 MDa to free protein. A similar profile was obtained with Tpit, another target of CRH signaling, but contrasts with NeuroD1 and Pitx1 profiles. Indeed, NeuroD1 is exclusively present in a ~ 500 kDa protein complex whereas Pitx1 is mainly found in its free form. The profiles were similar in CRH-treated AtT-20 cells. These findings suggest that NGFI-B and Nurr1 are present in high molecular weight protein complexes, which raises the possibility of an association with multiple protein complexes in AtT-20 cells.

In order to identify such NGFI-B-associated proteins, we produced AtT-20 cells expressing a tagged version of NGFI-B at levels that are similar to endogenous NGFI-B (Figure 2A). NGFI-B-associated proteins were purified from forskolin-treated AtT-20 nuclear extracts using a Flag-M2 affinity column followed by elution with Flag peptides (Figure 2B). This eluate was resolved by SDS-PAGE and the interacting proteins were

revealed by silver staining and analyzed by mass spectrometry (Figure 2C). All bands identified on Fig. 2C were only present in the eluate from Flag-NGFI-B-V5-His, but not mock transfected AtT-20 cells, except the three lower bands (EF-1 α , β -actin and TMOD3). Different subunits of known multiprotein complexes were identified such as BAF57 and BAF155 of the SWI/SNF complex and Chd4/Mi-2 β , MTA2 and p66 β of the Mi-2 β /NuRD repression complex. These proteins were present at similar levels in control and forskolin-treated AtT-20 cells (data not shown). In contrast, some proteins appeared more abundant in treated compared to control cells (Fig 2D): most interestingly, the transcriptional coregulator TIF1 β was among this group and it was more abundant in the eluate from forskolin-treated extracts. Other co-purified transcriptional cofactors included Mybbp1a and Pelp1. We did not detect the previously characterized NGFI-B coactivator Rb and SRC-2 in these experiments. This may be due to low expression levels of these proteins in AtT-20 cells.

We confirmed these interactions by reverse coimmunoprecipitation in HEK293T cells that overexpressed the different Flag-tagged polypeptides (Flag-X) identify by mass spectrometry with V5-His-tagged NGFI-B. This experiment confirmed the interactions between NGFI-B-V5-His and the different proteins tested; in contrast, the bHLH factor E47 used as control did not co-immunoprecipitated with NGFI-B (Figure 2E). The purification of these different proteins with NGFI-B suggests that they are part of large protein complexes similar to those described above (Fig. 1A). Indeed, we found that TIF1 β has a similar molecular weight distribution as Nurr1 and NGFI-B in AtT-20 nuclear extracts (Figure 1B) in agreement with the hypothesis that they may act together. It is also possible that NGFI-B is part of protein complexes of different molecular weights and that could relate to different profiles on Superose 6 such as the SRC-2 profile (Fig. 1B).

2.3.2 TIF1 β is a coactivator of NGFI-B and enhances POMC gene transcription

Previous analyses of POMC promoter sequences responsive to both CRH and NGFI-B identified the NurRE as target. The dimer-binding NurRE is much more responsive than the monomer-binding NBRE to NGFI-B, particularly to signal-activated NGFI-B (56). The putative action of TIF1 β on NGFI-B activity was tested directly using

simple NurRE and NBRE reporters in AtT-20 cells. TIF1 β behaved as a strong coactivator of NGFI-B dimers/NurRE compared to the NBRE (Figure 3A). These results suggest that TIF1 β could be a preferential coactivator of NGFI-B action.

Since the NurRE was previously shown to be important for POMC expression and responsiveness to NGFI-B, we tested whether TIF1 β could regulate POMC transcription. The intact POMC promoter was indeed activated by increasing amounts of TIF1 β (Figure 3B). Mutagenesis of the NBRE did not affect the ability of TIF1 β to enhance POMC transcription. In contrast, mutagenesis of the NurRE abolished the enhancement by TIF1 β . The *in vivo* importance of endogenous TIF1 β protein in POMC transcription was assessed directly using siRNA against TIF1 β in AtT-20 cells. The knock-down of TIF1 β was ascertained by Western blot (Figure 3C) and correlated with a reduction of POMC mRNA levels (Figure 3C). Thus, basal POMC expression is partly dependent on TIF1 β acting through the NurRE regulatory element.

2.3.3 TIF1 β potentiates both CRH and PKA signaling through the NurRE but not the Tpit/PitxRE and it is recruited to the POMC promoter

The NurRE and the cognate Nurs factors participate in basal activity as well as in CRH responsiveness of the POMC promoter (56;57). Consequently, we tested the ability of TIF1 β to enhance the stimulatory effect of CRH on Nur-dependent transcription in AtT-20 cells. As shown in Fig. 4A, the activity of the NurRE reporter was activated by CRH and this activation was reversed by Dex. The overexpression of TIF1 β alone did not affect basal reporter activity but potentiated both CRH and Dex/CRH responses. Accordingly, the response curve of the NurRE reporter to increasing doses of CRH was enhanced by TIF1 β (Figure 4B).

The CRH signaling pathway involves a rapid increase in cAMP levels (62) followed by activation of PKA (63). Previous work had identified NGFI-B and Tpit as endpoint effectors of PKA signaling, through the NurRE and Tpit/PitxRE respectively (58;77). We tested whether TIF1 β modulates PKA-dependent transcription using the NurRE reporter in AtT-20 cells. PKA stimulation alone had a strong effect on NGFI-B-dependent transcription and this effect was markedly potentiated by TIF1 β (Figure 4C). In contrast,

TIF1 β repressed activity of the *Tpit/PitxRE* reporter with or without PKA (Figure 4D). Thus, TIF1 β potentiates both CRH and PKA signaling through the NurRE. We next assessed recruitment of TIF1 β to the POMC promoter upon treatment of AtT-20 cells with CRH by the chromatin immunoprecipitation technique (ChIP). The recruitment of TIF1 β was enhanced on the POMC promoter upon CRH and DEX/CRH treatments (Figure 4E). Treatment with dexamethasone (Dex) which represses POMC transcription (53;78) does not affect TIF1 β recruitment to the POMC promoter, in accordance with previous data showing that Dex does not affect NGFI-B recruitment either (59). These results support a model in which TIF1 β is recruited to the POMC promoter following CRH stimulation to enhance POMC transcription; this model is also supported by the greater amount of TIF1 β associated with NGFI-B in extracts from forskolin-treated cells (Figure 2D).

2.3.4 Within the Nur family, NGFI-B is the preferred target of TIF1 β

To test whether all three members of the Nur subfamily are targets of TIF1 β , we investigated the effect of TIF1 β on NGFI-B, Nurr1 and NOR-1. Using the NurRE_{POMC} reporter in AtT-20 cells, we showed that TIF1 β is a coactivator for each Nur factor (Figure 5A). However, TIF1 β enhanced Nurr1 and NOR-1 activity to a lesser extent compared to NGFI-B. Previous analyses had shown that the NurRE_{POMC} reporter is preferentially activated by NGFI-B-containing dimers. In contrast, the NurRE_{consensus}, composed of two NBRE half-sites, does not exhibit preference for any Nur factor (57). Hence, we performed the same experiment with the NurRE_{consensus} reporter and as shown in Fig. 5B, TIF1 β preferentially activated NGFI-B activity compared to Nurr1 and NOR-1. These data suggest that TIF1 β preferentially interacts with NGFI-B within the Nur family.

2.3.5 TIF1 β synergizes with the coactivator SRC-2 for Nur-dependent transcription

SRC-2 was previously implicated in CRH/PKA-dependent activation of NGFI-B (58). Hence, we tested a putative collaboration between SRC-2 and TIF1 β using the NurRE reporter by cotransfection in AtT-20 cells. As shown in Fig. 6A, limiting amount of SRC-2 and TIF1 β synergistically enhanced NGFI-B-dependent activity on the NurRE reporter, suggesting that TIF1 β and SRC-2 may be part of the same transcriptional complex. We

next assessed a putative interaction between TIF1 β and SRC-2 *in vivo* using coimmunoprecipitation in HEK293T cells. Immunoprecipitation of Flag-tagged SRC-2 brought down HA-TIF1 β (Figure 6B). Thus, TIF1 β and SRC-2 may be part of a common transcriptional complex and thus synergistically enhance NGFI-B-dependent transcription. It is noteworthy that SRC-2 appears to be a less potent activator of NGFI-B activity compared to TIF1 β , but their combined action far surpasses their individual action (Figure 6A).

2.4 Discussion

The aim of this study was to identify and characterize NGFI-B-associated coregulatory proteins involved in hormonal regulation of POMC transcription. We now report that TIF1 β acts as a coactivator of orphan nuclear receptor NGFI-B and is implicated in CRH activation of POMC transcription. Indeed, TIF1 β is recruited to the POMC promoter upon CRH stimulation. This recruitment leads to enhancement of NGFI-B activity, concomitant with activation of POMC promoter activity (Fig.3). Furthermore, TIF1 β synergizes with the coactivator SRC-2 to enhance NGFI-B-dependent transcription. These results suggest an important role of TIF1 β in regulation of nuclear receptor mediated transcription in response to physiological signals.

2.4.1 Coactivator synergism

We observed synergistic activation of NGFI-B-dependent transcription by TIF1 β and SRC-2 (Fig. 6A). When assessed separately for coactivation of NGFI-B dimers, SRC-2 is a less potent activator of NGFI-B activity compared to TIF1 β . These results suggest that TIF1 β may be a preferred coactivator of NGFI-B compared to SRC-2. Alternatively, SRC-2 may require additional proteins or TIF1 β itself for maximal coactivation of NGFI-B. This is supported by the fact that SRC-2 binds to coactivator CBP/p300, and this interaction have been shown to be critical for transcriptional activation (79). Accordingly, TIF1 β may be recruited as part of a transcriptional complex with SRC-2 for NGFI-B-dependent transcription, as suggested by the fact that SRC-2 is able to immunoprecipitate TIF1 β (Fig. 6B). Future experimentation will be required to assess the existence of a transcriptional complex including SRC-2 and TIF1 β recruited to the POMC promoter in response to CRH. It was previously shown that the AF-1 domain of NGFI-B mediates coactivator recruitment

through direct protein: protein interactions (80). Further characterization of NGFI-B and TIF1 β interaction will be needed to define the domains responsible for this interaction.

Our results indicate that TIF1 β is present on the POMC promoter in basal conditions and its recruitment is enhanced upon CRH treatment (Fig. 4E). A similar recruitment was previously observed for SRC-2 (64). TIF1 β enhances POMC transcription only through the NurRE (Fig. 3B) and its presence is sufficient to potentiate CRH and PKA activation of NGFI-B-dependent transcription (Fig. 4B and 4C). In contrast, the coactivator SRC-2 can be recruited to the POMC promoter through the NurRE and the Tpit/PitxRE to enhance POMC transcription (77). This result underlines functional differences in the mechanisms of action of these proteins and may reflect the use of multiple signal integrators including TIF1 β and SRC-2 acting through different transcription factors for CRH activation. In agreement, CRH responsiveness is conferred by many regulatory elements including the NurRE and the Tpit/PitxRE (77).

Future experimentations will be needed to determine if TIF1 β is a direct target of phosphorylation events induced by the CRH/PKA signaling pathway. TIF1 β has been described as a protein kinase capable of autophosphorylation (35). However, the biological relevance of this activity has not yet been established. Its phosphorylation may represent an important step for enhancement of CRH activation of NGFI-B-dependent transcription. This interpretation is consistent with previous studies which have shown the importance of coactivator phosphorylation in transcription. Indeed, the phosphorylation of SRC-1 induced by cAMP was shown to enhance ligand-independent activity of the progesterone receptor (81). Also, both SRC-1 and SRC-3 were described as direct targets of MAPK phosphorylation and this phosphorylation was shown to be important for coactivator activity (82;83).

2.4.2 TIF1 β as coactivator

Few studies have described TIF1 β as a coactivator. TIF1 β appeared to be a coactivator of the bZIP transcription factor C/EBP β and the nuclear receptor GR for the induction of the α 1-acid glycoprotein gene by inflammatory cytokines and glucocorticoids (37). Our results combined to this previous study are the first evidences that describe TIF1 β

as a coactivator of different classes of transcription factors including nuclear receptors.

Future experimentation will be needed to define the domains of TIF1 β required for coactivation of NGFI-B. TIF1 β contains several conserved motifs including the RBCC domain, a Plant Homeo-Domain (PHD) finger followed by a bromodomain. These motifs have been shown to play important roles in protein: protein interactions. The RBCC domain of TIF1 β has been shown to interact directly with the KRAB domains of the zinc finger proteins (ZFPs) of the Krüppel type through a KRAB box for transcriptional repression (30-32). Moreover, the PHD finger and bromodomain act as a cooperative unit for transcriptional repression through recruitment of repressive enzymatic activities including the Mi-2 α subunit of the NuRD complex (17). These motifs were also shown to be important for transcriptional activation. Indeed, biochemical studies have shown that TIF1 β interacts directly with C/EBP β through the RBCC domain. More importantly, TIF1 β enhances C/EBP β activity through its C-terminal region containing the PHD finger and the bromodomain (37). Furthermore, a previous study has reported that the RBCC domain of PML is required for enhancement of the transcriptional activity of the progesterone receptor (84). Taken together, these data suggest that the RBCC domain, the PHD finger and the bromodomain are critical interfaces for protein: protein interactions with molecules that mediate transcriptional regulation.

Future investigations will address the physiological significance of TIF1 β recruitment to active and inactive genes. The ChIP-chip technology was used recently to identify every TIF1 β targets within the whole genome of Ntera2 cells using a whole-genome tiling arrays (85). This study focused on the recruitment of TIF1 β to repressed genes linked to repressive epigenetic modifications. The results indicate that one third of TIF1 β target promoters are associated with trimethylation of lysine 9 and 27 of histone H3. Moreover, the authors showed that TIF1 β is recruited within the transcribed gene regions of ZFP genes which contrast with the recruitment of TIF1 β to the promoter region of non ZFP genes (85). Further analyses will provide resourceful information in the understanding of the transcriptional mechanisms governed by TIF1 β to functionally link TIF1 β promoter targets with an epigenetic marker of active chromatin. In addition, CRH responsive genes in corticotrophs may represent targets of TIF1 β action. It would be of interest to analyze

whether a subset of TIF1 β target genes is modulated by CRH. In such case, TIF1 β could represent an integrator of CRH signaling that modulate its responses.

NGFI-B is an important physiological regulator that has been implicated at multiple levels of the HPA axis. The identification of TIF1 β as a coactivator of NGFI-B dimers may suggest a mechanism for coercing a corepressor like TIF1 β to act as coactivator. Indeed, the synergism between TIF1 β and SRC-2 for nuclear receptor mediated transcription may reflect a dependence on SRC-2 for the coactivator activity of TIF1 β . Further experiments to characterize interactions between TIF1 β and other coactivators may provide important insights in the mechanism of TIF1 β action.

2.5 Materials and methods

2.5.1 Plasmids

The reporter plasmids were constructed in pXP1-luc (67) containing the minimal POMC promoter (-34 to + 63 bp). The -480 POMC promoter with mutations of the NurRE and NBRE regulatory elements were described previously (68). The luciferase reporter plasmid containing three copies of the NurRE, the NBRE or the Tpit/PitxRE regulatory element were described (57;69). CMX-NGFI-B, CMX -Nurr1, CMX-NOR-1 and CMX-SRC-2 expression vectors have been previously generated (58;70). The plasmids pCGN-TIF1 β and pcDNA3-Flag-HA-TIF1 β are generous gifts from Dre Muriel Aubry (71). To generate the 3xFlag-NGFI-B-V5-His expression plasmid, we modified the pLNCX₂ (BD Biosciences) plasmid by insertion of an oligonucleotide the BglII and HindIII sites; it contained the 3x Flag (AGATCTCCACCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGA TTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAG) and V5-His (GGATCCGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCG TACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAAAGCTT) sequences. This insertion included a BamHI site for subsequent cloning of NGFI-B coding sequence (NM_010444). The NGFI-B-V5-His expression plasmid was produced as described above but without the 5' 3x Flag sequence. The expression plasmids for Flag-tagged TIF1 β (NM_011588), Pelp1 (NM_029231) and Mybbp1a (NM_016776) were generated as described above but without the 3' V5-His sequence. We generated expression plasmids for 3x Flag-tagged Mta2 (NM_011842), p66 β (NM_139304), SRC-2 (72) and E47 (AF352579) with a 3x Flag

insertion GGATCCGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACAT
CGACTACAAGGATGACGATGACAAGTGAAAGCTT.

2.5.2 Cell culture and transfection

AtT-20 and HEK293T cells were cultured in DMEM with 10 % fetal bovine serum and penicillin/streptomycin. AtT-20 cells were transfected by lipofection with lipofectamine (Invitrogen) as previously described (55). Briefly, 2.5×10^5 cells/well were plated in 12-well plates. A total of 1 μ g of DNA was used for each transfection (0-500 ng of expression vectors, 500 ng of reporter plasmid and pSP64), together with 5 μ L lipofectamine in a final volume of 200 μ L of DMEM without serum. The mixtures were incubated for 30 min at room temperature and then made up to 1 mL with DMEM. 500 μ L were distributed in each well previously rinsed with DMEM for 3 h. The DMEM was then replaced with fresh DMEM with 10 % serum. Cells were stimulated with CRH and/or Dexamethasone 4 h prior to harvest. Luciferase assays were performed 48 h post-transfection using lysis buffer (100 mM Tris pH 8, 0.5 % NP-40, 1 mM dithiothreitol (DTT) as described previously. Each transfection (in duplicates) was repeated at least 3 times using different preparations of expression vectors and reporter plasmids.

2.5.3 Generation of retrovirus-infected AtT-20 cells

The EcoPack-2 293 cells (Clontech, Mountain View, CA, USA) were plated (5×10^6) in a 10-cm plate and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method with 10 μ g of expression plasmid pLNCX₂-Flag-NGFI-B-V5-His for 8 hours. 16 h later, the medium containing the retrovirus was filtered with a 0.22 μ filter, diluted in DMEM 10 % fetal bovine serum with penicillin/streptomycin and 1 μ g/mL polybrene (Sigma) and added to AtT-20 cells. This infection procedure was repeated 3 times per day during 2 days and infected AtT-20 cells were cultured with 400 μ g/mL neomycin. The growing neomycin-resistant colonies were pooled together to generate a retroviral-infected population of about 5,000 independent colonies.

2.5.4 Nuclear extract preparation and Flag purification procedure

Nuclear extracts used for affinity Flag purification of flagged proteins was performed with 4×10^9 cells AtT-20 cells. The cells were washed twice with cold PBS and collected in a 50-mL tube. The cells were then centrifuged and resuspended in 10 vol of buffer A (20 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT, and the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, and pepstatin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each)) and centrifuged immediately. The cytoplasmic extract was prepared by resuspending the cell pellet in 2 vol of buffer A and leaving it at 4°C for 10 min with gentle mixing. The nuclei were collected by centrifugation, washed once with 1 vol of buffer A and extracted with the addition of 1 vol of buffer HS (20 mM Hepes pH 7.9, 500 mM KCl, 10 % glycerol, 3 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT, and the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, and pepstatin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each)). The nuclei were allowed to extract for 30 min at 4°C with continuous gentle mixing. The extract was centrifuged and the protein concentration of the supernatant was determined by Bradford assay (BioRad). The nuclear extracts were precleared at 4°C using IgG Sepharose 6 fast flow beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), A/G agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and agarose IgG bead (Sigma) for 1 h. The extracts were then diluted with 1 vol of IP 2x buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 10 % glycerol, 1.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT, 0.2 % Tween-20 and the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, and pepstatin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each)) and the supernatant was immunoprecipitated for 3 h at 4°C with α -Flag M2 or non-immune IgG cross-linked to agarose beads (Sigma). Immunoprecipitates were washed twice with IP buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 125 mM KCl, 5 % glycerol, 1.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA and 0.1 % Tween-20) and twice with IP buffer containing 300 mM KCl instead of 125 mM KCl. The eluate is obtained by incubating the bead with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 3xFlag peptide.

2.5.5 Mass spectrometry analysis

The eluate was resolved with on an 8 % SDS-polyacrylamide gel and the gel was silver stained. The protein bands were excised from the gel and subjected to reduction, alkylation and in-gel tryptic digestion as previously described (73). The resulting tryptic peptides were purified and identified by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.5.6 Coimmunoprecipitation assays and Western blot analysis

HEK293T cells (3×10^6) were plated in a 10-cm plate and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method with 5 μ g of expression plasmids for tagged polypeptides for 48 hours. The cells were then washed twice with cold PBS and then, centrifuged and resuspended in 5 vol of buffer A (20 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT, and the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, and pepstatin (10 μ g/ml each)) and centrifuged immediately. The cell pellet was resuspended in 2 vol of buffer A and cells were allowed to swell on ice for 10 min before the addition of 3 vol of buffer B (20 mM Hepes pH 7.9, 500 mM KCl, 10 % glycerol, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT, and the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, and pepstatin (10 μ g/ml each)). Nuclei were allowed to extract for 30 min at 4°C with continuous gentle mixing. The extract was centrifuged and the protein concentration of the supernatant was determined by Bradford assay (BioRad). The extracts were precleared at 4°C using IgG Sepharose 6 fast flow beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), A/G agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and agarose IgG bead (Sigma) and the supernatant was immunoprecipitated for 2 h at 4°C with α -Flag M2 cross-linked to agarose beads (Sigma). Immunoprecipitates were washed twice with buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 125 mM KCl, 5 % glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA and 0.1 % Tween-20) and twice with buffer D (buffer C with 300 mM KCl). After SDS-PAGE, Western blots were revealed with antibodies against V5 (R960-25, Invitrogen), Flag M2 (Sigma), hemagglutinin 12CA5 (ab16918, Abcam). Immunodetection was done with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (or mouse) IgG (Sigma) and revelation was performed with the ECL+ reagent (Amersham Biosciences) as described by the manufacturer.

2.5.7 Superose 6 gel filtration

Size fractionation of protein complexes was carried out on an AKTA FPLC apparatus with a Superose 6 10/30 column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Nuclear extracts as previously described (2 mg) were submitted to gel filtration fractionation and fractions of 500 μ L were collected. 80 μ L of each fraction were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western immunoblotting with specific antibodies. Molecular size standards were apoferritin (443 kDa) and thyroglobulin (669 kDa)

(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). After SDS-PAGE, Western blots were revealed with antibodies against Nurr1 (N83220, BD Bioscience), NGFI-B (58) Tpit (74), NeuroD1 (75), TIF1 β (ab10483, Abcam), Mybbp1a (M9600-04, US biological), SRC-2 3C11 (3Ti-3C11, Euromedex).

2.5.8 Chromatin Immunoprecipitation and QPCR

AtT-20 cells were treated or not for 30 min with 10^{-7} M CRH and/or 10^{-7} M dexamethasone (Dex) and prepared for ChIP as described (64). Supernatant of sonicated chromatin obtained from 10^7 cells was subjected to overnight immunoprecipitation at 4°C with 5 μ g of antibodies against TIF1 β (mouse monoclonal 1Tb3 (35)) and matched non-immune IgG (Sigma). Similar enrichments were obtained with rabbit polyclonal antibody against TIF1 β (PF64, (76)). Immunoprecipitates were collected with protein A/G agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) saturated with tRNA. Beads were washed and eluted as described (64). Quantitative real-time PCR (MX 3005, Stratagene, La Jolla, CA) was done with the SYBR Green kit (Qiagen, Valencia, CA). After correction with matching IgG control samples, the recruitment fold was calculated as the ratio between POMC promoter and the first exon of MyoD. The primers used are: MyoD sense, TGCTCCTTTGAGACAGCAGA; MyoD antisense, TTTCAGGAGGGCTCCCATGT, POMC promoter sense, TGGTTTCACAAGATATCACACTTTCCC; POMC promoter antisense, TCGGAGTGGAATTACCTATGTGCG.

2.5.9 siRNA and RT-QPCR

AtT-20 cells (6×10^5) were plated in 6-well plates and transfected with 50 nmols of siRNA against TIF1 β (ON-TARGET plus SMART pool, Dharmacon) or with a non-target siRNA (Dharmacon) using Lipofectamine (Invitrogen). Two days after transfection, total RNA and whole cell extracts from AtT-20 cells were performed for RT-QPCR analysis and protein expression analysis, respectively. Total RNA was prepared with the RNAeasy columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with 1 μ g of this RNA using oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) and SuperScript II RT (Invitrogen). The cDNA was then used for Quantitative real-time PCR (MX 3005, Stratagene, La Jolla, CA) with the SYBR Green kit (Qiagen, Valencia, CA). The primers used are the following: TIF1 β sense, GGATGT TCCAGGGGAGGAATGGAG; TIF1 β

antisense, CCAGGCTGCTCCATGGAGAATG; POMC sense, TGGAAGATGCCGAGATTCTGCTACAGT; POMC antisense, GATGCAAGCCAGCAGGTTGCTCTC; β -actin sense, TGAACCCTAAGGCCAACC GTGAAA; β -actin antisense, GTCCATCACAATGCCTGTGGTA. For the whole cell extracts, AtT-20 cells were harvested in cold PBS and extracted at 4°C for 30 min in a buffer containing 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.1% NP-40, 20 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors. After centrifugation, 25 μ g of protein extracts were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis with antibodies against TIF1 β (ab10483, Abcam) and DM1a α -tubuline (sc-32293, Santa Cruz biotechnology).

2.6 Acknowledgments

We are grateful to many colleagues from the laboratory for comments on this work and in particular we thank Aurélio Balsalobre for helpful comments, work supervision and for his help in cell culture. We thank Olivier Kirsh for sharing his experience in protein purification. David Langlais helped with siRNA transfection. Daphné Dupéré-Richer and Catherine Couture helped with plasmid constructs. We are thankful to Dr Muriel Aubry for her gift of plasmids and to Dr Régine Losson for the anti-TIF1 β antibodies. We are grateful to Denis Faubert and the members of the IRCM proteomic core lab for mass spectrometry analysis.

2.7 References

1. **Cosma MP** 2002 Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10:227-236
2. **Lonard DM, O'Malley BW** 2005 Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* 30:126-132
3. **McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW** 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344
4. **Rosenfeld MG, Glass CK** 2001 Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276:36865-36868
5. **Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE** 2002 Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475-487
6. **Li B, Carey M, Workman JL** 2007 The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707-719
7. **Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, Bellen HJ** 2001 Bonus, a *Drosophila* homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol Cell* 7:753-765
8. **Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, Losson R** 2000 Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development* 127:2955-2963
9. **Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R** 2004 TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem* 279:48329-48341
10. **Le DB, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P** 1996 A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J* 15:6701-6715
11. **Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, Zhou Y, Barut BA, Lin S, Kingsley PD, Palis J, Orkin SH, Zon LI** 2004 The zebrafish moonshine gene encodes

transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol* 2:E237

12. **Le DB, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R** 1995 The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J* 14:2020-2033
13. **Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, de TH** 1999 TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18:1209-1217
14. **Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, Aubry M** 2003 Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem* 278:22367-22373
15. **Peng H, Begg GE, Schultz DC, Friedman JR, Jensen DE, Speicher DW, Rauscher FJ, III** 2000 Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol* 295:1139-1162
16. **Peng H, Feldman I, Rauscher FJ, III** 2002 Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol* 320:629-644
17. **Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ, III** 2001 Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* 15:428-443
18. **Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, III** 2002 SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16:919-932
19. **Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF** 1995 The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20:56-59

20. **Jeanmougin F, Wurtz JM, Le DB, Chambon P, Losson R** 1997 The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22:151-153
21. **Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG** 2006 Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2
24. *Nature* 442:100-103
22. **Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ** 2006 Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF
3. *Nature* 442:91-95
23. **Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM** 1999 Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399:491-496
24. **vom BE, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le DB, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R** 1996 Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J* 15:110-124
25. **Fraser RA, Heard DJ, Adam S, Lavigne AC, Le DB, Tora L, Losson R, Rochette-Egly C, Chambon P** 1998 The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J Biol Chem* 273:16199-16204
26. **Remboutsika E, Lutz Y, Gansmuller A, Vonesch JL, Losson R, Chambon P** 1999 The putative nuclear receptor mediator TIF1alpha is tightly associated with euchromatin. *J Cell Sci* 112 (Pt 11):1671-1683
27. **Teyssier C, Ou CY, Khetchoumian K, Losson R, Stallcup MR** 2006 Transcriptional intermediary factor 1alpha mediates physical interaction and functional synergy between the coactivator-associated arginine methyltransferase 1 and glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nuclear receptor coactivators. *Mol Endocrinol* 20:1276-1286
28. **Zhong S, Delva L, Rachez C, Cenciarelli C, Gandini D, Zhang H, Kalantry S, Freedman LP, Pandolfi PP** 1999 A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RARalpha and T18 oncoproteins.

Nat Genet 23:287-295

29. **Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, Mark M** 2002 Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1beta is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* 129:2329-2337
30. **Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher FJ, III** 1996 KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev* 10:2067-2078
31. **Kim SS, Chen YM, O'Leary E, Witzgall R, Vidal M, Bonventre JV** 1996 A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15299-15304
32. **Moosmann P, Georgiev O, Le DB, Bourquin JP, Schaffner W** 1996 Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res* 24:4859-4867
33. **Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, Losson R** 2001 Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1422-1426
34. **Underhill C, Qutob MS, Yee SP, Torchia J** 2000 A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem* 275:40463-40470
35. **Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R** 1999 Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J* 18:6385-6395
36. **Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ, Rauscher FJ, III** 1999 KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 19:4366-4378

37. **Chang CJ, Chen YL, Lee SC** 1998 Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression. *Mol Cell Biol* 18:5880-5887
38. **Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW** 1992 Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6:2129-2135
39. **Milbrandt J** 1988 Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188
40. **Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K** 1994 Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells 1023. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1959-1965
41. **Bandoh S, Tsukada T, Maruyama K, Ohkura N, Yamaguchi K** 1997 Differential expression of NGFI-B and RNR-1 genes in various tissues and developing brain of the rat: comparative study by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Neuroendocrinol* 9:3-8
42. **Watson MA, Milbrandt J** 1990 Expression of the nerve growth factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development* 110:173-183
43. **Enmark E, Gustafsson JA** 1996 Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Mol Endocrinol* 10:1293-1307
44. **Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykonen I, Pelto-Huikko M** 1994 Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res Mol Brain Res* 25:234-241
45. **Parkes D, Rivest S, Lee S, Rivier C, Vale W** 1993 Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol Endocrinol* 7:1357-1367
46. **Murphy EP, Conneely OM** 1997 Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 11:39-47
47. **Davis IJ, Lau LF** 1994 Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14:3469-3483
48. **Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL** 1993 The orphan

- nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 13:861-868
49. **Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, de Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE** 2004 The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. implications for the control of adrenal functional zonation. *J Biol Chem* 279:37622-37630
 50. **Martin LJ, Tremblay JJ** 2005 The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells. *Endocrinology* 146:861-869
 51. **Levin N, Blum M, Roberts JL** 1989 Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expression by vasopressin in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 125:2957-2966
 52. **Lundblad JR, Roberts JL** 1988 Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr Rev* 9:135-158
 53. **Birnberg NC, Lissitzky JC, Hinman M, Herbert E** 1983 Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6982-6986
 54. **Martens C, Bilodeau S, Maira M, Gauthier Y, Drouin J** 2005 Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 19:885-897
 55. **Philips A, Maira M, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, Drouin J** 1997 Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17:5952-5959
 56. **Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J** 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells PHILIPS1997. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951
 57. **Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J** 1999 Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19:7549-7557

58. **Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, Drouin J** 2003 Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol* 23:763-776
59. **Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, Figarella-Branger D, Brue T, Berthelet F, Lacroix A, Batista D, Stratakis C, Hanson J, Meij B, Drouin J** 2006 Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev* 20:2871-2886
60. **Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W** 1998 Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19:162-166
61. **Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E** 2002 Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16:1638-1651
62. **Labrie F, Veilleux R, Lefevre G, Coy DH, Sueiras-Diaz J, Schally AV** 1982 Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. *Science* 216:1007-1008
63. **Reisine T, Rougon G, Barbet J, Affolter HU** 1985 Corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotropin hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary tumor cells by liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8261-8265
64. **Batsche E, Desroches J, Bilodeau S, Gauthier Y, Drouin J** 2005 Rb enhances p160/SRC coactivator-dependent activity of nuclear receptors and hormone responsiveness. *J Biol Chem* 280:19746-19756
65. **Belandia B, Orford RL, Hurst HC, Parker MG** 2002 Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J* 21:4094-4103
66. **Xu J, Li Q** 2003 Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17:1681-1692
67. **Nordeen SK** 1988 Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and

enhancers. *Biotechniques* 6:454-458

68. **Therrien M, Drouin J** 1991 Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492-3503
69. **Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J** 1996 Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 10:1284-1295
70. **Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM** 1991 Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65:1255-1266
71. **Mascle XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estephan P, Aubry M** 2007 Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem* 282:10190-10202
72. **Benecke A, Chambon P, Gronemeyer H** 2000 Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep* 1:151-157
73. **Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, Cagney G, Emili A, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt JF** 2002 RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol* 22:6979-6992
74. **Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J** 2001 A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859
75. **Poulin G, Turgeon B, Drouin J** 1997 NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
76. **Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Vonesch JL, Huss-Garcia Y, Chambon P, Losson R** 2002 Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J Cell Sci* 115:3439-3448
77. **Maira M, Couture C, Le MG, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J** 2003 The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 co-activators and mediates hormone action. *J*

Biol Chem 278:46523-46532

78. **Eberwine JH, Roberts JL** 1984 Glucocorticoid regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription in the rat pituitary. *J Biol Chem* 259:2166-2170
79. **Voegel JJ, Heine MJ, Tini M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H** 1998 The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 17:507-519
80. **Wansa KD, Harris JM, Muscat GE** 2002 The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem* 277:33001-33011
81. **Rowan BG, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW** 2000 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 20:8720-8730
82. **Font de MJ, Brown M** 2000 AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20:5041-5047
83. **Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW** 2000 Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275:4475-4483
84. **Guiochon-Mantel A, Savouret JF, Quignon F, Delabre K, Milgrom E, de TH** 1995 Effect of PML and PML-RAR on the transactivation properties and subcellular distribution of steroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 9:1791-1803
85. **O'geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, Farnham PJ** 2007 Genome-Wide Analysis of KAP1 Binding Suggests Autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet* 3:e89

2.8 Figure legends

Figure 1 The orphan nuclear receptors NGFI-B and Nurr1 are part of high molecular weight protein complexes. A and B, Nuclear extracts from AtT-20 cells were subjected to a size-fractionation on a Superose 6 gel filtration column. Fractions were analyzed by Western blot using specific antibody as indicated on the left of each panel. Fraction numbers and size standards are denoted on top. Vo, void volume; 443 kDa, apoferritin; 669 kDa, thyroglobulin.

Figure 2 Proteins associated with NGFI-B in AtT-20 nuclear extracts. A, Comparison of NGFI-B and Flag-NGFI-B-V5-His levels in the pool of infected and control AtT-20 cells. Western blotting with antibodies against NGFI-B was performed on whole cell extracts of the indicated cells. B, Purification scheme used to purify NGFI-B interacting proteins from AtT-20 nuclear extracts. C, Identification of NGFI-B-associated proteins. The eluate from the Flag-M2 column was subjected to SDS-PAGE followed by silver staining. Gel slices were excised and digested with trypsin. The identity of the indicated bands was determined by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF analysis. D, Comparison of NGFI-B associated proteins in forskolin-treated compared to control AtT-20 cells. E, Confirmation of the interactions found by mass spectrometry by coimmunoprecipitation of NGFI-B-V5-His with Flag-tagged polypeptides. HEK293T cells were transfected with expression vectors as indicated on left and NGFI-B-V5-His was revealed by immunoblotting (IB) with anti-V5 after immunoprecipitation (IP) of Flag-tagged polypeptide (Flag-X).

Figure 3 TIF1 β enhances POMC gene transcription and NGFI-B-dependent transcription. A, The NurRE is much more responsive to TIF1 β enhancement of NGFI-B-dependent activity than the NBRE in AtT-20 cells. Increasing amounts of pCGN-TIF1 β expression plasmid (10, 25, 50, 100 and 250 ng) enhance NGFI-B-dependent activity of the NurRE reporter (left) and, to a lesser extent, of the NBRE reporter (right). Basal activity of these reporters is repressed by increasing amounts of TIF1 β (right). B, TIF1 β enhances POMC gene transcription through the NurRE but not the NBRE. Increasing amounts of pCGN-TIF1 β expression vector (125, 250 and 500 ng) were transfected with different

POMC promoter constructs fused to the luciferase reporter gene in POMC-expressing AtT-20 cells. The intact promoter construct (-480 to +63 bp) and a promoter mutation in the NBRE regulatory element were similarly responsive to TIF1 β whereas a NurRE mutant and minimal promoters were unresponsive. C, Western blot analysis of TIF1 β and α -tubulin expression in AtT-20 cell extracts transfected with a pool of four siRNAs against TIF1 β (50 nM); α -tubulin was used as loading control. D, Endogenous TIF1 β is important for basal POMC mRNA expression in AtT-20 cells. Transfection of a pool of four siRNAs against TIF1 β (50 nM) decreased endogenous mRNA levels of TIF1 β and POMC compared to β -actin mRNA in AtT-20 cells. Endogenous mRNAs were quantitated by RT-QPCR. Data represent the means \pm s.e.m. of three experiments each performed in duplicates.

Figure 4 TIF1 β enhances CRH and PKA responses. A and B, TIF1 β enhances CRH response of the NurRE reporter. In A, transfection of AtT-20 cells with an expression vector for TIF1 β (pCGN-TIF1 β , 100 ng) enhances CRH activation of the NurRE reporter but doesn't modulate basal activity or Dex repression. In B, a dose-response curve with increasing concentrations of CRH with or without expression vector for TIF1 β (pCGN-TIF1 β , 100 ng). C and D, TIF1 β potentiates PKA enhancement of the NurRE reporter but not the Tpit/PitxRE reporter. AtT-20 cells were transfected with expression vectors for PKA (25 ng) and/or TIF1 β (pCGN-TIF1 β , 250 ng) to assess their effect on NurRE (C) and Tpit/PitxRE (D) reporters. E, Chromatin immunoprecipitation was performed in AtT-20 cells treated with or without 10^{-7} M CRH and/or 10^{-7} M Dex to show recruitment of TIF1 β to the POMC promoter. Recruitment is shown for the POMC promoter relative to the MyoD exon1. Data represent the means \pm s.e.m. of three experiments each performed in duplicates.

Figure 5 NGFI-B is a preferred target of TIF1 β . A, TIF1 β coactivates preferentially NGFI-B on a NurRE reporter. AtT-20 cells were transfected with pCGN-TIF1 β expression vector (100 ng) and increasing amounts of expression vectors for each Nur factor (5, 10 and 20 ng) along with the NurRE_{POMC} (A) or the reporter NurRE_{CONSENSUS} (B).

Figure 6 Synergistic action of TIF1 β and SRC-2 of NGFI-B-dependent transcription. A, SRC-2 potentiates the activity of TIF1 β . AtT-20 cells were transfected with the NurRE

reporter and with SRC-2 and/or pCGN-TIF1 β expression vectors (50, 100, 150, 200 and 300 ng). B, Coimmunoprecipitation of HA-TIF1 β with Flag-tagged SRC-2. HEK293T cells were transfected with expression vectors for HA-TIF1 β or Flag-SRC-2 as indicated. HA-TIF1 β and Flag-SRC-2 were revealed by immunoblotting (IB) with anti-HA and anti-Flag respectively after immunoprecipitation (IP) of Flag-SRC-2.

2.9 Figures

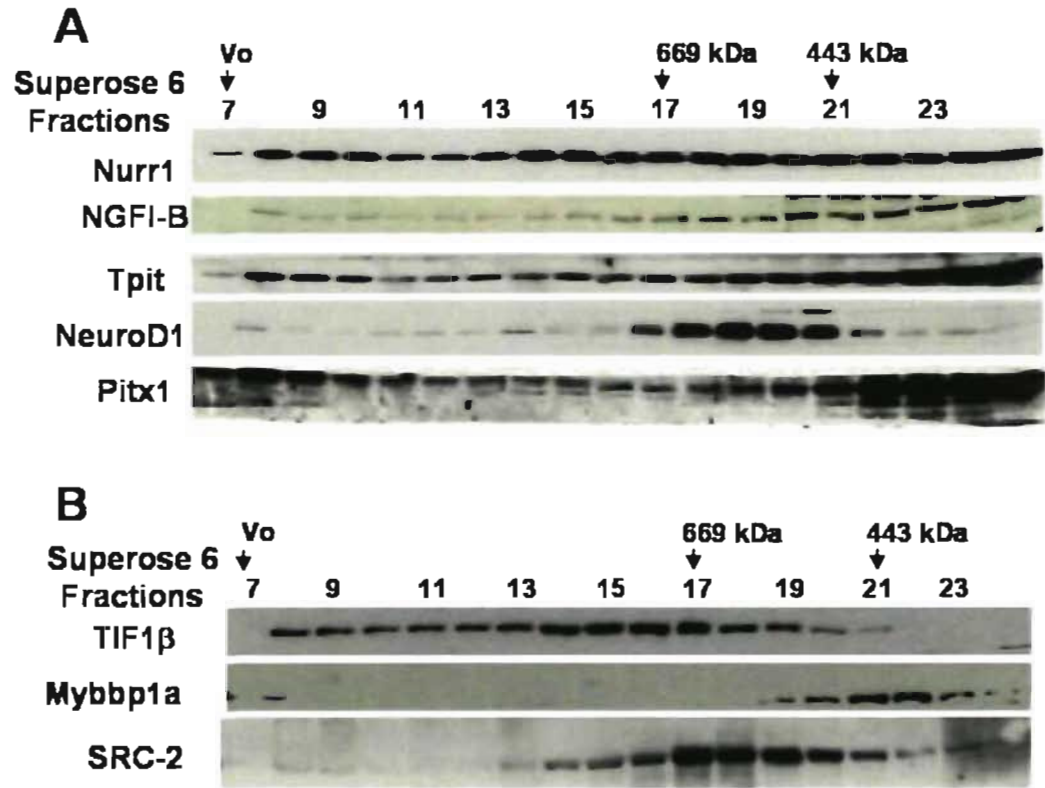


Figure 1

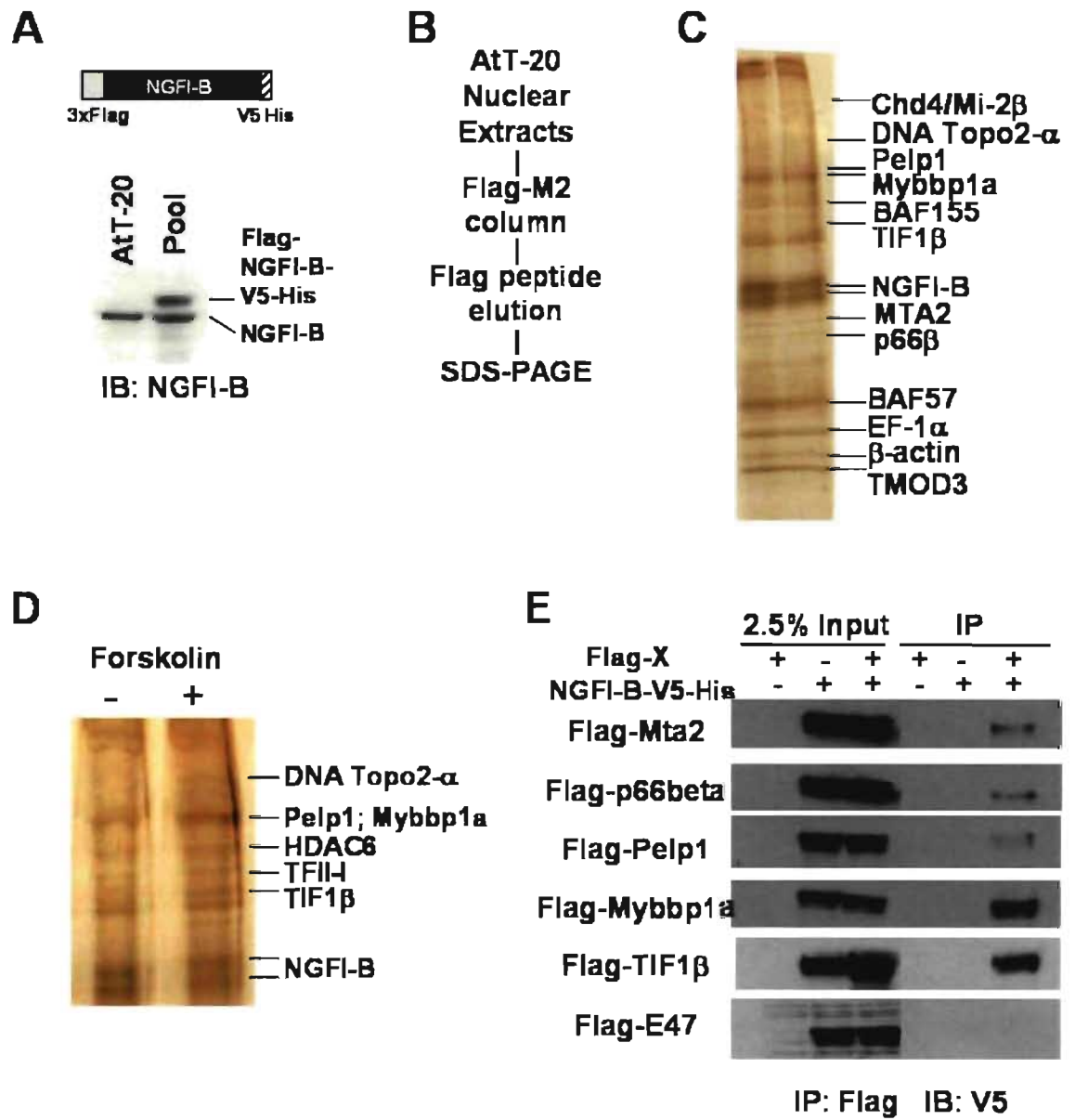


Figure 2

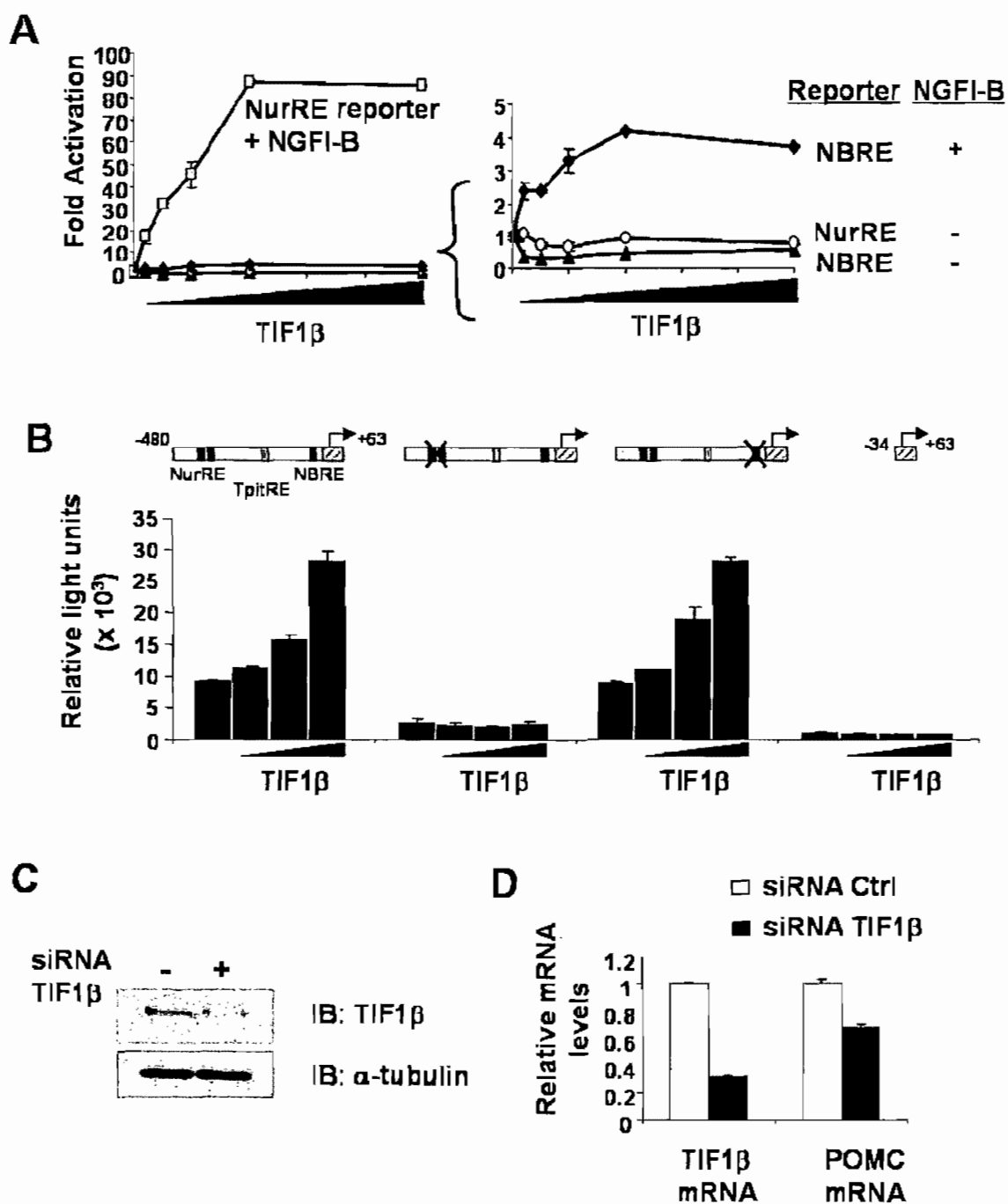


Figure 3

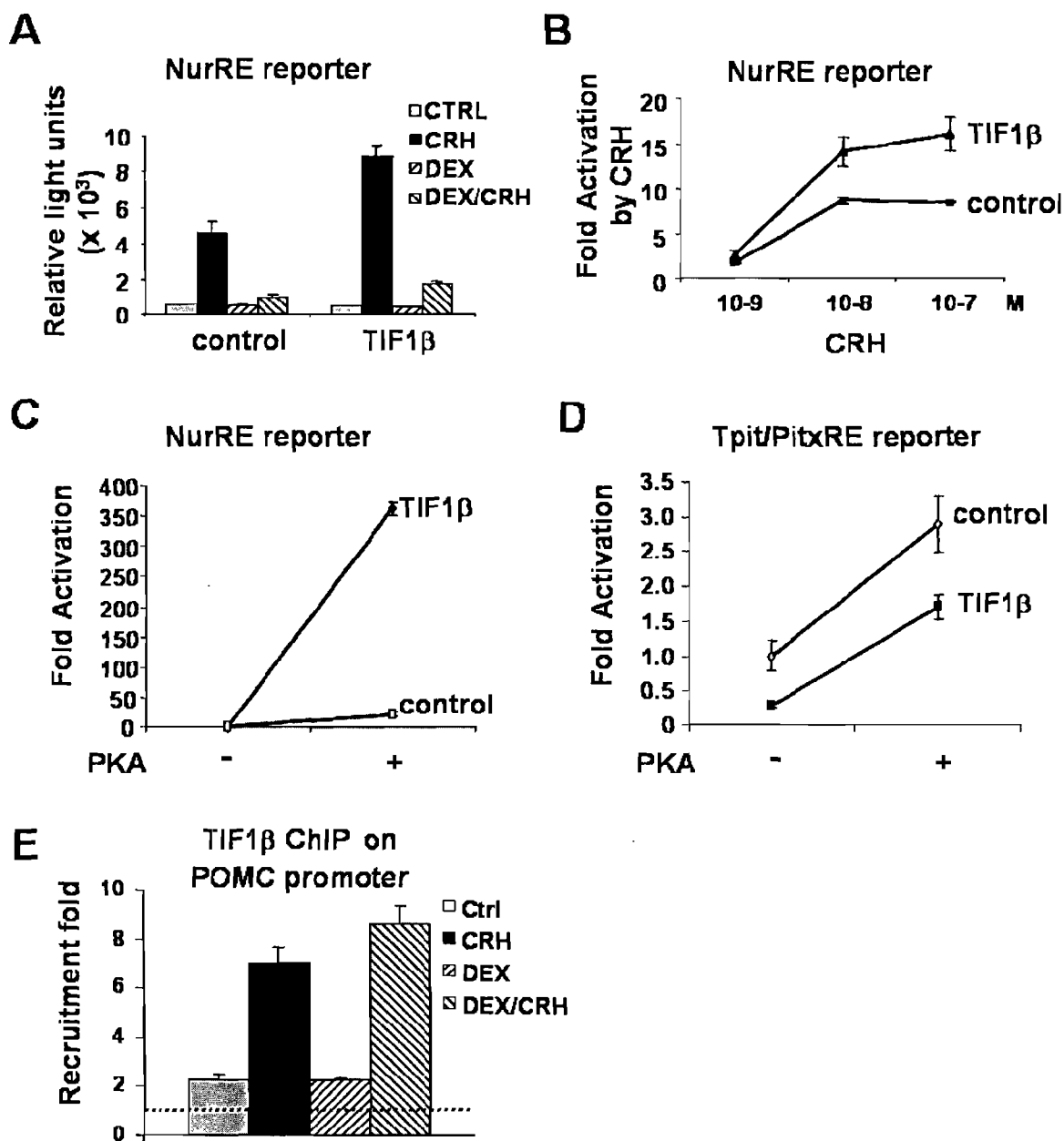


Figure 4

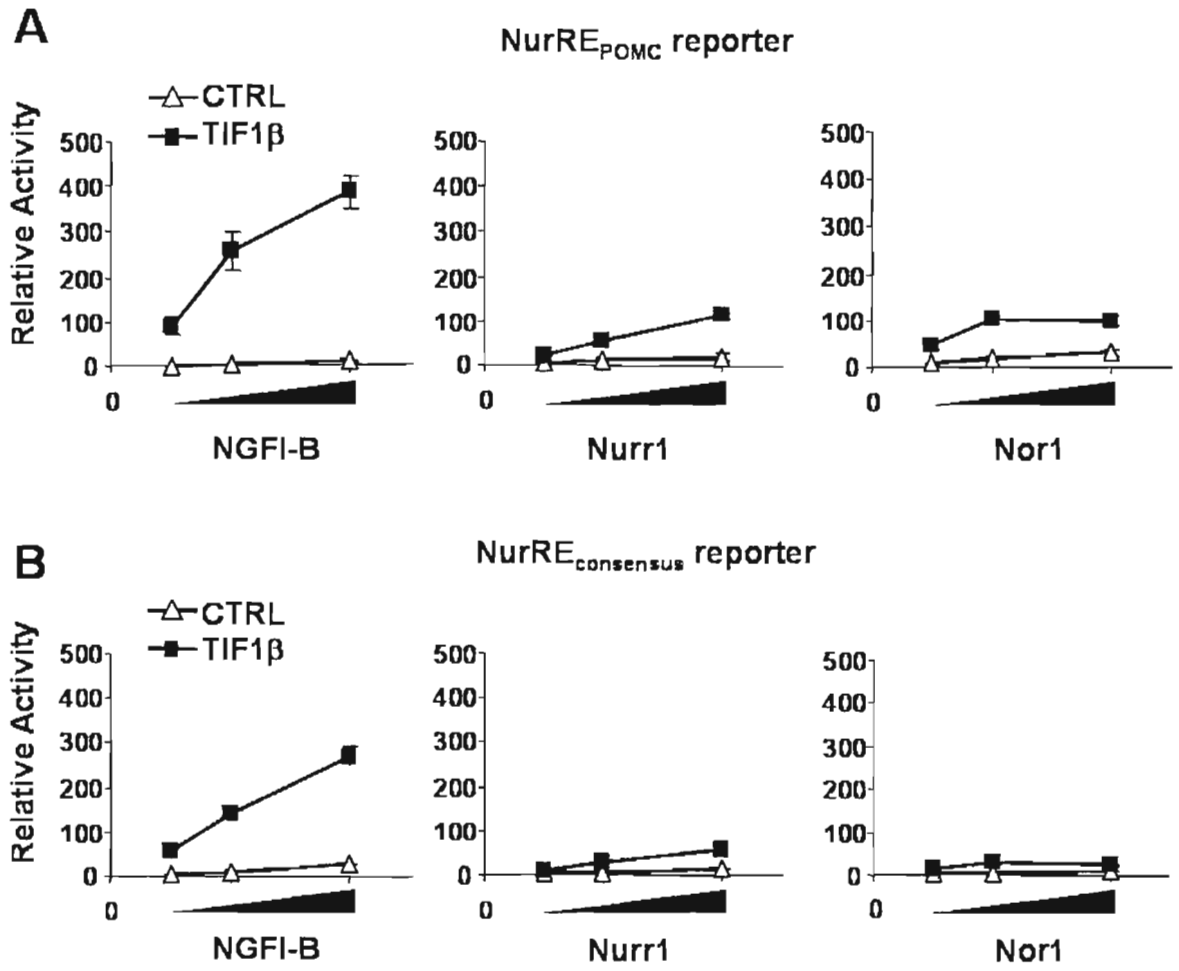


Figure 5

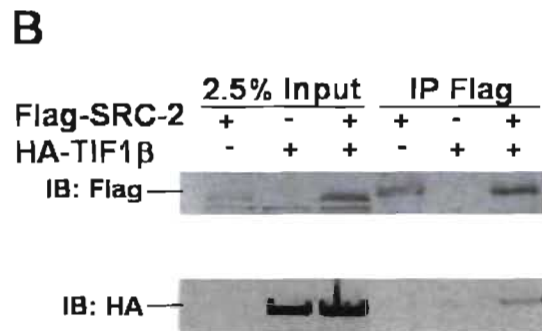
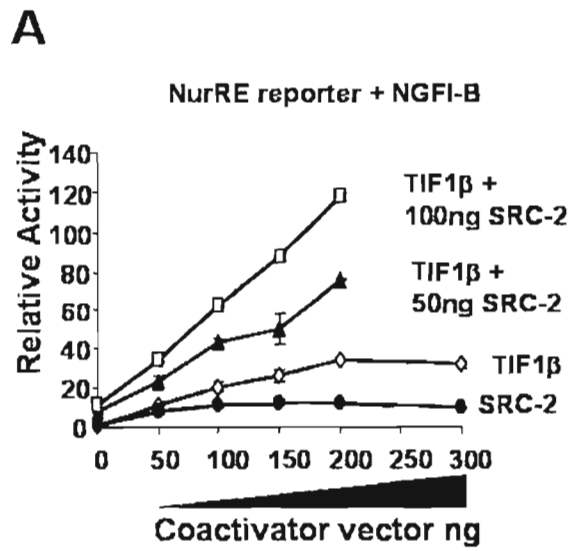


Figure 6

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 3. Discussion et perspectives

La littérature présente très peu d'information quant aux mécanismes d'activation de la transcription par NGFI-B. Ces mécanismes incluent d'une part des modifications post-traductionnelles qui modulent sa localisation intracellulaire et sa liaison à l'ADN, et d'autre part le recrutement de co-activateurs transcriptionnels. L'identification de tels co-activateurs est cruciale car elle fournit des indices sur la façon dont NGFI-B active la transcription. Cependant, très peu de co-activateurs de NGFI-B ont été identifiés et les données d'identification de ces co-activateurs reposent sur des interactions protéine : protéine *in vitro* ainsi que sur l'utilisation du système Gal4-VP16 en cellules mammifères (Wansa *et al.*, 2002). En plus, à l'exception des co-activateurs de la famille SRC/p160, la plupart de ces candidats n'ont pas été testés sur des gènes cibles et n'ont pas été intégrés dans un système biologique. Parmi les autres co-régulateurs qui ont été identifiés, notons p300, p/CAF, DRIP-205 et ASC-2 (Sohn *et al.*, 2001; Wansa *et al.*, 2002). L'identification et la caractérisation des co-régulateurs de NGFI-B représentent un point important dans la compréhension des mécanismes de régulation de la transcription par NGFI-B au sein des systèmes biologiques dont celui-ci fait partie.

Le gène POMC est un modèle très intéressant pour l'étude des mécanismes transcriptionnels en réponse à divers signaux. En effet, la transcription de ce gène est activée par la CRH et réprimée par les glucocorticoïdes. NGFI-B représente un point de contrôle essentiel dans la régulation hormonale du gène POMC puisqu'il est impliqué dans l'activation par la CRH et dans le mécanisme de *trans*-répression par les glucocorticoïdes via son élément NurRE. Ainsi, il devient intéressant de purifier les protéines s'associant à NGFI-B dans une perspective de comprendre les mécanismes de régulation hormonale du gène POMC. En utilisant les cellules AtT-20 comme modèle des cellules corticotropes, j'ai procédé à la purification et à l'identification des partenaires de NGFI-B par spectrométrie de masse. J'ai identifié plusieurs partenaires protéiques. Ces protéines ont été analysées pour leur capacité de moduler la transcription du gène POMC et l'activation transcriptionnelle par la CRH. Les travaux présentés dans ce mémoire définissent le rôle de TIF1 β dans la transcription du gène POMC et dans la réponse au CRH. J'ai caractérisé TIF1 β comme co-activateur de NGFI-B qui agit en synergie avec le co-activateur SRC-2. De plus, TIF1 β contribue de façon importante à l'activation transcriptionnelle induite par

les signaux CRH et PKA.

3.1 Co-régulateurs potentiels de NGFI-B

Plusieurs protéines ont été identifiées lors de la purification de NGFI-B à partir d'extraits nucléaires d'AtT-20 (Figure 2C). Ces protéines sont en grande majorité des co-régulateurs transcriptionnels. Cependant, la pertinence biologique de l'interaction de ces co-régulateurs avec NGFI-B est inconnue pour le moment et nécessite d'être validée. Néanmoins, les mécanismes d'action précédemment décrits pour la plupart de ces protéines nous permettent de spéculer quant à une fonction putative de ces protéines sur la transcription dépendante de NGFI-B. Il s'agit des protéines BAF57 et BAF155 du complexe SWI/SNF, Mta2, p66 β et Mi-2 β du complexe NuRD, ainsi que Mybbp1a, TopoII α et Pelp1.

Parmi les protéines identifiées, il y a les sous-unités BAF57 et BAF155 du complexe SWI/SNF. Ce complexe est connu comme pouvant rehausser l'activité de nombreux récepteurs nucléaires (Muchardt and Yaniv, 1993; Chiba *et al.*, 1994; Fryer and Archer, 1998; Belandia *et al.*, 2002). La sous-unité BAF57 est d'un intérêt particulier puisqu'elle a été caractérisée en tant que régulateur critique de la fonction de récepteurs nucléaires dont le récepteur des androgènes AR et le récepteur des oestrogènes ER α (Link *et al.*, 2005; Garcia-Pedrero *et al.*, 2006). En effet, la perte d'expression de BAF57 compromet l'activité de ces récepteurs *in vivo*.

D'autre part, l'identification de BAF57 et BAF155 suggère un rôle potentiel pour les sous-unités accessoires BAF en plus de la sous-unité ATPase Brg-1 dans le mécanisme de *trans*-répression du gène POMC exercée par GR. En effet, ces protéines pourraient être importantes pour la spécificité d'action du complexe SWI/SNF dans le mécanisme de remodelage de la chromatine en réponse aux signaux hormonaux activateur (CRH) et répresseur (glucocorticoïdes). Un tel rôle putatif nécessite d'être examiné. Des expériences de siRNA contre les sous-unités spécifiques du complexe permettront de déterminer la contribution relative de celles-ci dans l'activation transcriptionnelle par CRH et la répression par les glucocorticoïdes.

Ce concept peut aussi s'appliquer aux protéines du complexe NuRD. Ce complexe contient une activité de remodelage de la chromatine ATP-dépendant et de désacétylation

via les histone désacétylases HDAC 1 et 2 (Knoepfler and Eisenman, 1999). Il a précédemment été suggéré que les complexes SWI/SNF et Mi-2 β ont des fonctions antagonistes dans le contrôle de l'expression génique lors de la réponse inflammatoire : le complexe SWI/SNF est requis pour l'activation de certains gènes de la réponse secondaire et le complexe Mi-2 β est co-recruté pour limiter cette induction (Ramirez-Carrozzi *et al.*, 2006). Dans le cas de la régulation du gène POMC, un mécanisme similaire pourrait être suggéré pour renverser l'activation transcriptionnelle par la CRH en réponse aux glucocorticoïdes.

Mybbp1a a été découvert en tant que partenaire du facteur de transcription Myb et comme co-activateur du récepteur nucléaire AhR (Tavner *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2002). J'ai étudié le rôle de Mybbp1a dans la transcription du gène POMC et comme co-régulateur putatif de NGFI-B et. Des résultats préliminaires suggèrent que Mybbp1a est un activateur de la transcription basale du gène POMC et un co-activateur de NGFI-B. Cependant, ce facteur ne semble pas contribuer à l'activation transcriptionnelle dépendante de la CRH et le mécanisme d'action de cette protéine demeure largement inconnu.

TopoII α a été identifié comme partenaire de NGFI-B lors de la purification d'affinité. TopoII est une enzyme qui contrôle la structure topologique de l'ADN. Elle génère des coupures dans l'ADN double brin et catalyse les changements topologiques en permettant le passage d'une hélice d'ADN à travers cette coupure. Très récemment, une nouvelle et intéressante étude a fait état de l'importance de la coupure de l'ADN double brin pour la transcription du gène *pS2* en réponse à l'œstrogène (Ju *et al.*, 2006). Les auteurs ont démontré que l'activité catalytique de TopoII était requise pour l'activation transcriptionnelle du gène *pS2* en réponse aux oestrogènes et pour le recrutement subséquent de co-activateurs et de l'ARN polymérase II. L'implication de TopoII dans la transcription a été un sujet d'étude depuis nombreuses années puisque cette capacité de TopoII de générer des coupures dans l'ADN double brin permet de surpasser les barrières topologiques tel le super-enroulement de l'ADN. Ainsi, l'activation transcriptionnelle par NGFI-B pourrait dépendre en partie du recrutement de l'activité TopoII au promoteur de certains gènes cibles. Cependant, des études au niveau génomique sont requises pour déterminer le ou les types de promoteurs nécessitant une coupure double brin. Dans le cas

du promoteur du gène POMC, il est connu que plusieurs facteurs de transcription occupent de façon constitutive le promoteur (Bilodeau *et al.*, 2006). Contrairement au gène *pS2* qui requiert la présence d'estradiol pour être activé, le gène POMC est constitutivement actif transcriptionnellement. Par conséquent, il est nécessaire de connaître à quelle étape de la transcription la coupure double brin joue un rôle dans l'activation.

Pelp1 a précédemment été identifié comme co-activateur de ER (Vadlamudi *et al.*, 2001). C'est une protéine de 160 kDa qui possède neuf motifs LXXLL caractéristiques des co-activateurs. Cependant, Pelp1 se comporte comme un co-répresseur de GR, NF- κ B, NGFI-B et du complexe AP-1 (Choi *et al.*, 2004). J'ai tenté de reproduire cet effet de répression de l'activité de NGFI-B avec Pelp1 dans les AtT-20 mais je n'ai observé aucun effet. Récemment, un groupe d'étude a découvert que l'acide rétinoïque *9-cis* induit l'expression du co-régulateur transcriptionnel Pelp1 (Singh *et al.*, 2006). En retour, Pelp1 agit comme co-activateur du récepteur RXR α en augmentant son activité de transactivation en réponse à l'acide rétinoïque *9-cis*. L'identification de Pelp1 comme protéine s'associant à NGFI-B permet de suggérer quelques hypothèses intéressantes quant à une voie d'étude du rôle de Pelp1 sur l'activité de NGFI-B et dans la signalisation des rétinoïdes. En effet, NGFI-B et Nurr1 sont connus comme pouvant hétérodimériser avec les récepteurs RXR (α , β et γ) et lier l'élément DR5 (Perlmann *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1995). L'activation transcriptionnelle par RXR en présence de l'acide rétinoïque *9-cis* est également observée sur un NBRE. Il peut être envisageable qu'un hétérodimère NGFI-B : RXR contrôle l'expression de certains gènes cibles via le co-activateur Pelp1, sous l'influence des signaux induits par les facteurs de croissance et les rétinoïdes. Des exemples de synergie entre les rétinoïdes et les facteurs de croissance ont été décrits dans le contrôle de l'expression génique (Cho and De Robertis, 1990; Kent *et al.*, 1994). Ainsi, cet hétérodimère représente donc un effecteur potentiel pouvant répondre à des signaux physiologiques.

3.2 Mécanismes d'action de TIF1 β

3.2.1 Synergie entre TIF1 β et SRC-2

Les données présentées dans ce mémoire suggèrent que TIF1 β est un co-activateur transcriptionnel d'un dimère de NGFI-B. En effet, TIF1 β rehausse fortement l'activité de

NGFI-B sur le NurRE comparativement au NBRE (Figure 3A). Ce résultat suggère la nécessité d'une cible dimérique de NGFI-B pour l'effet co-activateur de TIF1 β . Un résultat similaire a précédemment été observé pour les co-activateurs de la famille SRC/p160; les SRCs rehaussent l'activité de NGFI-B uniquement sur l'élément NurRE et non sur le NBRE (Maira *et al.*, 2003b). Par ailleurs, les données suggèrent que TIF1 β est un co-activateur de NGFI-B qui agit en synergie avec le co-activateur SRC-2 sur l'élément NurRE (Figure 6A). Un dimère de NGFI-B semble donc conférer une interface protéique critique pour permettre une co-activation maximale par TIF1 β et SRC-2. Ce résultat soulève donc la possibilité que TIF1 β et SRC-2 soient inclus dans un même complexe transcriptionnel. En accord avec cette hypothèse, j'ai montré que TIF1 β pouvait immunoprécipiter SRC-2 (Figure 6B). Il serait important de vérifier la présence d'un tel complexe par des expériences de co-immunoprécipitation de TIF1 β et SRC-2 au niveau endogène. L'interaction observée entre TIF1 β et SRC-2 peut être de nature directe ou indirecte et peut dépendre de la présence de NGFI-B. Des expériences de « pull-down » *in vitro* permettraient de répondre à cette question en vérifiant la possibilité d'une interaction directe entre TIF1 β et SRC-2 en absence/présence de NGFI-B. Pour le moment, je n'ai pas présenté de données démontrant la nature directe de l'interaction entre NGFI-B et TIF1 β mais des résultats préliminaires obtenus récemment au laboratoire le suggèrent.

L'hypothèse selon laquelle TIF1 β et SRC-2 peuvent être inclus au sein d'un même complexe transcriptionnel pour co-activer un dimère de NGFI-B soulève l'implication d'une dimérisation des deux familles de co-régulateurs. En accord avec cette hypothèse, une étude récente a fait état d'une interaction coopérative entre SRC-2 et TIF1 α qui rehausse l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (Teyssier *et al.*, 2006). La possibilité d'une hétérodimérisation entre TIF1 β et SRC-2 pourrait représenter un mécanisme de coopération permettant le recrutement de diverses activités enzymatiques pour activer la transcription. Il est connu que les SRCs jouent des rôles majeurs dans le remodelage de la chromatine possiblement via le recrutement direct ou indirect de co-activateurs incluant CBP/p300, p/CAF, CARM-1 et PRMT-1 (Koh *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). De telles données sont cependant inexistantes pour TIF1 β . Dans ce sens, il serait intéressant de purifier et d'identifier les protéines qui interagissent avec TIF1 β par une approche protéomique et de tester leur fonction sur l'activité de TIF1 β en

transfection transitoire. Une seconde approche consisterait à tester des candidats au potentiel co-activateur qui pourraient avoir un effet positif sur l'activité de TIF1 β . Les co-activateurs identifiés pour NGFI-B pourraient constituer un premier choix: Brg-1, p300, DRIP205/TRAP220, Mybbp1a et ASC-2. ASC-2 est un candidat intéressant puisqu'il agit comme co-activateur indirect de NGFI-B (Sohn *et al.*, 2001) et possède une activité *trans*-activatrice dépendante de CBP/p300 (Lee *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'activation synergique de TIF1 β et SRC-2 peut présager une dépendance de TIF1 β envers SRC-2 pour l'activation transcriptionnelle. Le cas inverse est également possible. Une telle hypothèse peut être vérifiée par deux approches complémentaires. La première consiste à évaluer le potentiel co-activateur de TIF1 β avec un gène rapporteur dans des cellules n'exprimant aucun des SRCs ou dont l'expression des SRCs est inhibée par des siRNA. La seconde approche consiste à étudier le recrutement de TIF1 β au promoteur en ChIP en présence d'un siRNA contre SRC-2. Dans le cas d'une dépendance de TIF1 β pour SRC-2, l'activation transcriptionnelle par TIF1 β ainsi que son recrutement au promoteur seront diminués.

3.2.2 Régulation de la transcription du gène POMC par TIF1 β

TIF1 β est un activateur de la transcription du gène POMC et cette activation dépend uniquement de l'élément régulateur distal NurRE; elle ne requiert pas l'élément NBRE (Figure 3B). Ces résultats sont en accord avec le fait que TIF1 β rehausse significativement l'activité du dimère de NGFI-B (rapporteur NurRE) contrairement au monomère (rapporteur NBRE) (Figure 3A). À ce niveau, il est important de noter que TIF1 β exerce un effet répresseur de l'activité de base du rapporteur NurRE, un effet opposé à celui observé en présence de NGFI-B cotransfecté (Figure 3A) ou en présence d'une stimulation CRH (Figure 4A). Il est probable qu'une surexpression de TIF1 β entraîne une séquestration du NGFI-B endogène sous forme libre, réduisant ainsi l'activité basale du rapporteur NGFI-B dépendant. Par conséquent, une surexpression concomitante de NGFI-B et TIF1 β favorise l'activation de la transcription en déplaçant l'équilibre vers la formation de complexes NGFI-B : TIF1 β actifs sur la séquence NurRE du rapporteur. Poursuivant cette idée, l'activation de la signalisation CRH peut possiblement conduire à l'activation et au recrutement de NGFI-B sur son élément de réponse NurRE, deux éléments favorables à

l'activation de la transcription en présence d'une surexpression de TIF1 β . Collectivement, ces résultats suggèrent que TIF1 β agit sur la forme activée de NGFI-B recruté sur l'ADN, ce qui est en accord avec l'observation du recrutement de TIF1 β sur le promoteur du gène POMC en condition basale et qui est fortement rehaussé en condition CRH (Figure 4E). De plus, ce dernier résultat suggère que TIF1 β agit sur l'activité de base du promoteur et contribue à l'activation transcriptionnelle par la CRH. À ce stade, il serait important de démontrer que TIF1 β est recruté au promoteur du gène POMC via NGFI-B. Pour ce faire, l'utilisation de la technique de double ChIP serait appropriée : une première ChIP avec NGFI-B suivi d'une seconde avec TIF1 β permettrait de confirmer la présence simultanée des deux protéines au promoteur.

Nos résultats démontrent que TIF1 β potentialise la réponse au CRH ainsi que l'activation par PKA, et ce uniquement via l'élément régulateur NurRE (Figure 4C/D). Ainsi, TIF1 β est un acteur clef dans l'activation transcriptionnelle par la CRH médiée par les facteurs Nur. Nous avons précédemment observé un recrutement similaire pour SRC-2 au promoteur du gène POMC dans les conditions basale et stimulée CRH (Batsche *et al.*, 2005a). SRC-2 est possiblement recruté au promoteur via le NurRE et le Tpit/PitxRE pour activer la transcription en réponse au CRH (Maira *et al.*, 2003a; Maira *et al.*, 2003b). Collectivement, ces résultats suggèrent que TIF1 β et SRC-2 agissent différemment au promoteur pour activer la transcription. Ils suggèrent également l'existence de protéines intégrant les signaux CRH et agissant via divers facteurs de transcription pour l'activation par CRH. Cette seconde hypothèse est en accord avec le fait que plusieurs éléments du promoteur du gène POMC sont requis pour la réponse au CRH (Maira *et al.*, 2003a). Il serait intéressant de vérifier si TIF1 β et SRC-2 sont présents en même temps sur le promoteur du gène POMC pour activer la transcription. Pour ce faire, il s'agirait de réaliser une double ChIP, c'est-à-dire une ChIP TIF1 β suivi d'une ChIP SRC-2. Un résultat positif serait en accord avec l'utilisation de plusieurs intégrateurs de signaux pour l'activation transcriptionnelle par CRH et avec la synergie observée entre TIF1 β et SRC-2. Dans le cas contraire, il est possible que le mécanisme d'activation implique le recrutement de ces co-activateurs de façon séquentielle ou combinatoire.

Le mécanisme d'action précis de TIF1 β est cependant inconnu pour le moment. Il implique fort probablement le recrutement de protéines/activités enzymatiques pouvant

affecter l'activité du promoteur via la modification de la chromatine et le recrutement de l'ARN polymérase II. La vérification de cette hypothèse s'avère essentielle pour la compréhension des mécanismes d'activation transcriptionnelle par TIF1 β . Une première voie d'étude consisterait à la caractérisation du ou des domaines d'interaction entre NGFI-B et TIF1 β par « pull-down » et du ou des domaines responsables de l'activité co-activatrice en transfection transitoire sur l'élément NurRE. Plus de détails concernant les mécanismes d'activation pourront provenir de l'identification des protéines s'associant aux domaines conférant une activité transcriptionnelle à TIF1 β . L'utilisation du double hybride s'avère être une technique judicieuse pour l'identification de tels partenaires en utilisant une banque d'ADNs complémentaires générée à partir des cellules AtT-20.

Une autre hypothèse quant au mode d'action de TIF1 β repose sur une récente étude qui fait état de la sumoylation de TIF1 β . Cette étude établit l'importance de la sumoylation de TIF1 β au niveau du mécanisme de répression de la transcription (Masclé *et al.*, 2007). Les auteurs démontrent que la mutagenèse de tous les sites accepteurs de SUMO situés dans la région C-terminale de TIF1 β abolit sa capacité de répression et que la sumoylation semble être requise pour le recrutement de complexes contenant une activité HDAC. Enfin, l'interaction entre TIF1 β et les protéines à domaine KRAB régule positivement cette sumoylation (Masclé *et al.*, 2007). La sumoylation pourrait représenter un mécanisme régulant l'activité de TIF1 β dépendamment des protéines qui le recrutent. Dans le cas où TIF1 β est recruté comme co-activateur, sa sumoylation pourrait être inhibée pour permettre le recrutement d'activités enzymatiques activatrices. Il est aussi possible que la sumoylation soit nécessaire pour renverser sa fonction co-activatrice en co-répresseur pour finement réguler la transcription. Dans le cas du NurRE_{POMC}, il est possible que la sumoylation de TIF1 β ne soit pas impliquée dans le mécanisme de répression par les glucocorticoïdes. En effet, nous avons observé que la surexpression de TIF1 β entraîne un léger effet d'activation dans la condition où le taux activé par la CRH est renversé par la Dex (Figure 4A). À ce stade, il devient important de faire la démonstration de la contribution de la sumoylation dans l'activation transcriptionnelle par TIF1 β . Il s'agit de comparer le potentiel co-activateur de TIF1 β sauvage par rapport au mutant déficient des sites accepteurs de SUMO par transfection transitoire sur le rapporteur NurRE. Dans le cas où la mutagenèse augmente l'effet co-activateur de TIF1 β , cela suggère que la sumoylation est impliquée dans les fonctions répressives de TIF1 β et supporte le rôle de la sumoylation dans la

régulation de l'activité transcriptionnelle de TIF1 β .

De façon générale, la fonction des co-activateurs identifiés jusqu'à présent dans le mécanisme d'activation du gène POMC par la CRH est peu documentée au niveau de la chromatine. Nous savons que la CRH augmente le recrutement de l'ARN polymérase II au promoteur ainsi que sur les exons du gène POMC. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de la variation de l'acétylation des histones H3 et H4 (Bilodeau *et al.*, 2006). Il y a beaucoup de travail à faire pour étudier le positionnement des nucléosomes sur le locus du gène POMC et leurs modifications, ainsi que la dynamique de ces modifications sur le promoteur en condition de stimulation CRH. Il est cependant probable que la CRH agisse à d'autres niveaux. Les co-activateurs ciblés par la CRH pourraient faciliter le recrutement du complexe médiateur, déplacer des co-répresseurs, moduler l'activité des protéines déjà présentes au promoteur et stimuler le remodelage de la chromatine et l'élongation.

3.2.3 Activation de la transcription via les facteurs Nur

L'étude révèle que parmi les trois membres de la sous-famille Nur, TIF1 β est un co-activateur préférentiel de NGFI-B (Figure 5). En effet, Nurr1 et NOR-1 sont activés par TIF1 β de façon intermédiaire et faible respectivement par rapport à NGFI-B. Ce résultat s'applique à la fois pour l'élément NurRE_{POMC} et pour le NurRE_{CONSENSUS}. Cette hypothèse pourrait toutefois être renforcée en vérifiant le niveau d'affinité de l'interaction entre TIF1 β et les facteurs Nur. D'autre part, ce résultat semble suggérer que TIF1 β démontre une spécificité d'action sur les facteurs Nur pour l'activation transcriptionnelle de leurs gènes cibles malgré la redondance fonctionnelle qui existe entre ceux-ci. Néanmoins, il serait important d'étudier l'effet de TIF1 β sur les différentes combinaisons d'hétérodimères pour valider cette hypothèse.

Le mécanisme précis par lequel NGFI-B recrute TIF1 β ou d'autres co-régulateurs est inconnu. Une étude a clairement démontré que NGFI-B est fortement phosphorylé à son domaine AF-1 qui est responsable de l'activité de *trans*-activation (Davis *et al.*, 1993). De plus, NGFI-B est rapidement modifié par des événements de phosphorylation sur les résidus sérines (Fahrner *et al.*, 1990; Hazel *et al.*, 1991). Enfin, plusieurs études suggèrent que l'activité de NGFI-B est régulée par ces modifications post-traductionnelles qui ont

pour but de réguler son activité (Katagiri *et al.*, 1997; Li and Lau, 1997). Cependant, il existe peu de données précises sur l'importance et la contribution de ces phosphorylations sur l'activité de NGFI-B. Entre autres, la phosphorylation de NGFI-B pourrait représenter un événement nécessaire pour le recrutement de co-activateurs. Je propose ainsi de définir les modifications post-traductionnelles de NGFI-B. Pour ce faire, il s'agit de purifier une quantité suffisante de NGFI-B. Par la suite, on génère des peptides tryptiques par digestion à la trypsine et on détermine la masse de ces peptides par spectrométrie de masse. Avec un appareil performant, on détermine la masse avec une précision telle qu'il est possible d'identifier les types de modifications sur des fragments peptidiques. L'importance des résidus de NGFI-B qui ont été ciblés sera étudiée à l'aide de mutants dans des études d'interactions protéine : protéine avec les partenaires identifiés. Ces mutants seront aussi évalués pour leur capacité d'activer la transcription en réponse aux voies de signalisation PKA et MAPK. Cette étude permettra de générer beaucoup d'information qui sera utile pour la compréhension des mécanismes régulant l'activité de NGFI-B.

3.3 Rôle de TIF1 β *in vivo*

La présence de TIF1 β sur le promoteur du gène POMC qui est rehaussée par une stimulation CRH (Figure 4E) et la réduction d'expression du gène POMC par un siRNA anti-TIF1 β (Figure 3D) sont des données qui suggèrent que TIF1 β est une protéine importante dans la régulation de la transcription du gène POMC et dans la biologie des cellules corticotropes de l'hypophyse. Notre modèle situe TIF1 β comme un activateur de la transcription du gène POMC et un effecteur direct de l'activation de la transcription par la CRH via les facteurs Nur. D'une vision plus générale, la contribution de TIF1 β pourrait s'insérer au niveau de l'axe HPA; suite à un stress, TIF1 β répond à la signalisation induite par la CRH et il est recruté sur le promoteur du gène POMC pour activer la transcription en coopération avec SRC-2. Ultimement, cet effet a pour but d'augmenter la production d'ACTH.

Ce modèle nécessite d'étudier le rôle *in vivo* de TIF1 β par invalidation génique conditionnelle en croisant la souris TIF1 β ^{Flox/Flox} (Cammass *et al.*, 2000) avec la souris POMC-Cre du laboratoire. L'ablation génique complète de TIF1 β a déjà été décrite et elle est létale au stade embryonnaire puisqu'elle conduit à un défaut post-implantation (Cammass *et al.*, 2000). Cette expérience vise à déterminer l'effet de la perte de TIF1 β dans

les corticotropes différenciées exprimant la POMC. L'hypothèse primaire est que la perte de TIF1 β entraîne une diminution de la production d'ACTH et par conséquent une réduction de la quantité d'ACTH plasmatique. La seconde hypothèse est que la perte de TIF1 β abroge la réponse à la CRH, plus particulièrement la réponse au stress. Pour valider ou infirmer ces hypothèses, une première approche consiste à évaluer qualitativement la présence d'ACTH et de Tpit dans les corticotropes par immuno-histochimie. Cette expérience permet de déterminer si les niveaux de TIF1 β sont nécessaires pour permettre l'expression du gène POMC et le maintien des cellules corticotropes. Une expérience complémentaire consiste à mesurer quantitativement les niveaux d'ACTH et de corticostérone plasmatiques de ces souris invalidées pour TIF1 β par rapport aux souris contrôles en condition basale et en condition de stress prolongé. Une réduction des niveaux d'ACTH circulant et de corticostérone en condition de stress pourrait suggérer que la perte de TIF1 β entraîne une déficience de l'axe HPA. Dans le cas où aucun changement significatif des concentrations plasmatiques d'ACTH ou de corticostérone ne serait mesuré, il est possible qu'il y ait redondance fonctionnelle avec d'autres facteurs ou que TIF1 β ne soit pas nécessaire pour la fonction de l'axe HPA.

Comme il a été mentionné précédemment, SRC-2 a été décrit comme participant aux mécanismes d'activation de la transcription du gène POMC en réponse à la CRH (Maira *et al.*, 2003b). Ce co-activateur peut ainsi exercer de la redondance fonctionnelle avec TIF1 β et faire en sorte qu'aucun phénotype ne soit observé chez la souris invalidée pour TIF1 β . La double invalidation génique conditionnelle de TIF1 β et SRC-2 est réalisable mais représente un grand défi. Cependant, il est connu que les membres SRC exercent de la redondance fonctionnelle entre eux. Par ailleurs, il a été montré que SRC-1, 2 et 3 peuvent efficacement activer NGFI-B sur son élément NurRE d'où la complexité de cette étude (Maira *et al.*, 2003b).

3.4 TIF1 β vs TIF1 α

TIF1 α est connu comme étant un co-régulateur des récepteurs nucléaires. Il interagit de façon ligand-dépendant avec les récepteurs nucléaires (Le *et al.*, 1995). Il agit en tant que co-activateur transcriptionnel de récepteurs nucléaires en coopération avec CARM-1 et SRC-2 (Teyssier *et al.*, 2006) dans l'activation et également au sein d'un complexe transcriptionnel avec PML et l'hétérodimère RXR α /RAR α (Zhong *et al.*, 1999). Il serait

intéressant de vérifier s'il y a redondance fonctionnelle ou spécificité d'action au sein des membres de la famille TIF1 dans le mécanisme d'activation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires. Jusqu'à présent, aucune étude n'a fait état de similitudes entre ces deux membres à ce sujet. Cependant, le phénotype léthal de la souris invalidée pour TIF1 β suggère des fonctions qui ne sont pas partagées entre TIF1 β et les autres membres de la famille.

Il est maintenant connu que TIF1 β et TIF1 α interagissent *in vivo* (Germain-Desprez et al., 2003). Cette interaction pourrait représenter un mécanisme de régulation essentiel dans l'activation de la transcription. Ainsi, je propose de vérifier si TIF1 α est un co-activateur de NGFI-B en utilisant les rapporteurs NurRE et NBRE, et s'il agit comme activateur de la transcription du gène POMC. De plus, il est intéressant de vérifier si TIF1 β active la transcription en coopération avec TIF1 α et SRC-2. Enfin, l'expérience pertinente visant à valider la redondance ou la spécificité fonctionnelle entre TIF1 β et TIF1 α consiste à étudier le recrutement de TIF1 α au promoteur du gène POMC sous stimulation hormonale CRH et Dex. En effet, nos résultats indiquent que TIF1 β est fortement enrichi au promoteur sous stimulation CRH (Figure 4E).

3.5 TIF1 β comme intégrateur de signaux

L'implication de TIF1 β dans le mécanisme d'activation de la transcription par la CRH suggère que TIF1 β pourrait être une cible de divers événements de phosphorylation induits par la CRH. L'observation que TIF1 β est impliqué dans le rehaussement de l'activation par la PKA (Figure 4C) indique que TIF1 β peut être ciblé par les voies de signalisation qui découlent de PKA. Les voies de signalisation induites par la CRH et activées par PKA sont en partie définies et impliquent des cascades de kinase dont la CamKII et la voie MAPK (Kovalovsky *et al.*, 2002). Je propose ainsi de vérifier si TIF1 β est soumis à des événements de phosphorylation. Pour ce faire, il s'agit de réaliser l'immunoprécipitation de TIF1 β en conditions dénaturantes à partir d'extraits nucléaires d'AtT-20 stimulés ou non par la CRH et de vérifier la présence de tyrosines, de thréonines ou de sérines phosphorylées par immunobuvardage avec les anticorps spécifiques correspondants. Il serait également intéressant de procéder à des essais kinase *in vitro* en étudiant la capacité des principales kinases effectrices de la voie CRH à phosphoryler

TIF1 β , telles PKA et ERK1/2 (Kovalovsky *et al.*, 2002). Il serait également possible de déterminer la présence de phosphates sur TIF1 β par spectrométrie de masse. La phosphorylation de TIF1 β pourrait faciliter son interaction avec NGFI-B. À l'inverse, il est probable que la signalisation induite par la CRH cible uniquement NGFI-B et que certains événements de phosphorylation soient nécessaires pour le recrutement de TIF1 β .

D'autre part, je propose que TIF1 β pourrait se comporter comme intégrateur des signaux CRH et ainsi agir au niveau de la régulation de ses gènes cibles. Au laboratoire, nous avons généré des données d'expression pour tous les gènes exprimés dans les AtT-20 ainsi que tous les gènes dont l'expression est modulée par la CRH. En tant qu'intégrateur des signaux CRH, TIF1 β pourrait moduler l'expression génique des corticotropes en réponse à la CRH en étant recruté sur des gènes cibles. La première étape d'une telle analyse consiste à identifier tous les gènes cibles de TIF1 β dans les AtT-20 par la technique de ChIP-chip en utilisant les puces de génome complet. Une telle étude a fait état des gènes cibles de TIF1 β dans les cellules de carcinomes de testicules humains, Ntera2 (O'geen *et al.*, 2007). Cette étude a entre autres montré que les ZFP-KRAB non exprimés dans ces cellules étaient liés par TIF1 β . Il est donc attendu que des données similaires soient obtenues en fonction des ZFP-KRAB non exprimés dans les AtT-20.

La seconde étape consiste à établir un recoupement des données entre les données d'expression des gènes modulés par CRH et les gènes cibles de TIF1 β . En agissant comme intégrateur, TIF1 β devrait théoriquement se retrouver sur un certain nombre de gènes modulés par CRH. Dans le cas contraire, on pourrait imaginer que la signalisation CRH nécessite plusieurs effecteurs pour moduler l'expression génique des AtT-20.

Pour compléter l'analyse, il serait également important de déterminer quels sont les gènes qui sont activés et réprimés par TIF1 β . Pour ce faire, il s'agit de transfecter les AtT-20 avec un siRNA contre TIF1 β et d'obtenir des données d'expression des gènes de ces cellules comparativement aux cellules contrôles. Le recoupement de ces données d'expression avec les données des gènes cibles de TIF1 β permettra de définir quels gènes sont activés ou réprimés par TIF1 β et parmi ceux-ci, quels sont ceux qui sont modulés par la CRH.

3.6 Conclusion

L'identification de TIF1 β comme co-répresseur et co-activateur soulève plusieurs questions et hypothèses quant aux mécanismes d'action de cette protéine au niveau de la structure de la chromatine et de la machinerie transcriptionnelle de base. De plus en plus d'évidences suggèrent que TIF1 β régule l'expression d'un gène via l'assemblage de protéines ayant la capacité de modifier l'état de la chromatine. Cependant, ces données n'excluent pas la possibilité qu'il existe d'autres mécanismes du contrôle de l'expression génique par TIF1 β . La quête et la compréhension de tels mécanismes moléculaires permettront de comprendre la fonction de TIF1 β dans plusieurs processus biologiques incluant le développement précoce embryonnaire, la spermatogenèse et la différenciation cellulaire. Enfin, les études visant à comprendre la pertinence *in vivo* de TIF1 β et des autres membres de la famille pourront fournir des indices précieux quant aux fonctions physiologiques des membres de la famille TIF1 chez les mammifères.

BIBLIOGRAPHIE

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, and Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, **277**, 965-968.

Arimura A, vn PM, Schroder AJ, and Rothman PB (2004) The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *J Biol Chem*, **279**, 31105-31112.

Autelitano DJ, Lundblad JR, Blum M, and Roberts JL (1989) Hormonal regulation of POMC gene expression. *Annu Rev Physiol*, **51**, 715-726.

Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, and Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet*, **24**, 410-414.

Ballard PL (1989) Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr Rev*, **10**, 165-181.

Bamberger CM, Schulte HM, and Chrousos GP (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, **17**, 245-261.

Bandoh S, Tsukada T, Maruyama K, Ohkura N, and Yamaguchi K (1997) Differential expression of NGFI-B and RNR-1 genes in various tissues and developing brain of the rat: comparative study by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Neuroendocrinol*, **9**, 3-8.

Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, de Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, and Rainey WE (2004) The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates transcription of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. implications for the control of adrenal functional zonation. *J Biol Chem*, **279**, 37622-37630.

Batsche E, Desroches J, Bilodeau S, Gauthier Y, and Drouin J (2005a) Rb enhances p160/SRC coactivator-dependent activity of nuclear receptors and hormone responsiveness. *J Biol Chem*, **280**, 19746-19756.

Batsche E, Moschopoulos P, Desroches J, Bilodeau S, and Drouin J (2005b) Retinoblastoma and the related pocket protein p107 act as coactivators of NeuroD1 to enhance gene transcription. *J Biol Chem*, **280**, 16088-16095.

Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, and Bellen HJ (2001) Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol Cell*, **7**, 753-765.

Behan DP, Linton EA, and Lowry PJ (1989) Isolation of the human plasma corticotrophin-releasing factor-binding protein. *J Endocrinol*, **122**, 23-31.

Belandia B, Orford RL, Hurst HC, and Parker MG (2002) Targeting of SWI/SNF

- chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J*, **21**, 4094-4103.
- Berry M, Metzger D, and Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*, **9**, 2811-2818.
- Bertagna X (1994) Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **23**, 467-485.
- Bilezikjian LM, Woodgett JR, Hunter T, and Vale WW (1987) Phorbol ester-induced down-regulation of protein kinase C abolishes vasopressin-mediated responses in rat anterior pituitary cells. *Mol Endocrinol*, **1**, 555-560.
- Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, Figarella-Branger D, Brue T, Berthelet F, Lacroix A, Batista D, Stratakis C, Hanson J, Meij B, and Drouin J (2006) Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev*, **20**, 2871-2886.
- Birnberg NC, Lissitzky JC, Hinman M, and Herbert E (1983) Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 6982-6986.
- Bishop JF and Mouradian MM (1993) Characterization of a corticotropin releasing hormone responsive region in the murine proopiomelanocortin gene BISHOP1993. *Mol Cell Endocrinol*, **97**, 165-171.
- Bishop JF, Rinaudo MS, Ritter JK, Chang AC, Conant K, and Gehlert DR (1990) A putative AP-2 binding site in the 5' flanking region of the mouse POMC gene. *FEBS Lett*, **264**, 125-129.
- Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL, and Loeffler JP (1995) Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol Endocrinol*, **9**, 745-755.
- Boutillier AL, Sassone-Corsi P, and Loeffler JP (1991) The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol Endocrinol*, **5**, 1301-1310.
- Brody JS and Williams MC (1992) Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu Rev Physiol*, **54**, 351-371.
- Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, and Cone RD (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*, **141**, 3518-3521.
- Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, and Losson R (2004) Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev*, **18**, 2147-2160.

- Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, and Losson R (2000) Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development*, **127**, 2955-2963.
- Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Vonesch JL, Huss-Garcia Y, Chambon P, and Losson R (2002) Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J Cell Sci*, **115**, 3439-3448.
- Canny BJ, Funder JW, and Clarke IJ (1989) Glucocorticoids regulate ovine hypophysial portal levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in a stress-specific manner. *Endocrinology*, **125**, 2532-2539.
- Castillo SO, Baffi JS, Palkovits M, Goldstein DS, Kopin IJ, Witta J, Magnuson MA, and Nikodem VM (1998) Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci*, **11**, 36-46.
- Castro MG and Morrison E (1997) Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol*, **11**, 35-57.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, and De Souza EB (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci*, **15**, 6340-6350.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, and Baulieu E-E (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* **265**, 20686-20691.
- Chang AC, Cochet M, and Cohen SN (1980) Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4890-4894.
- Chang AC, Israel A, Gazdar A, and Cohen SN (1989) Initiation of pro-opiomelanocortin mRNA from a normally quiescent promoter in a human small cell lung cancer cell line. *Gene*, **84**, 115-126.
- Chang CJ, Chen YL, Lee SC (1998) Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression. *Mol Cell Biol* **18**:5880-5887.
- Charmandari E, Tsigos C, and Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*, **67**, 259-284.
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, and Evans RM (1997a) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, and Cone RD (1997b) Exocrine

gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell*, **91**, 789-798.

Cheng LE, Chan FK, Cado D, and Winoto A (1997) Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J*, **16**, 1865-1875.

Chiba H, Muramatsu M, Nomoto A, and Kato H (1994) Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1815-1820.

Cho KW and De Robertis EM (1990) Differential activation of *Xenopus* homeo box genes by mesoderm-inducing growth factors and retinoic acid. *Genes Dev*, **4**, 1910-1916.

Choi YB, Ko JK, and Shin J (2004) The transcriptional corepressor, PELP1, recruits HDAC2 and masks histones using two separate domains. *J Biol Chem*, **279**, 50930-50941.

Chrousos GP and Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, **267**, 1244-1252.

Clark AJ, Lavender PM, Besser GM, and Rees LH (1989) Pro-opiomelanocortin mRNA size heterogeneity in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J Mol Endocrinol*, **2**, 3-9.

Cohick WS and Clemmons DR (1993) The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, **55**, 131-153.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein 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.

Cone RD (1999) The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, **10**, 211-216.

Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, and Kesterson RA (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res*, **51**, 287-317.

Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, and Stenzel-Poore MP (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*, **24**, 403-409.

Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, Lee SL, and Milbrandt J (1995) Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **15**, 4331-16.

Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J, and Lau LF (1993) Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol Endocrinol*, **7**, 953-964.

- Davis IJ and Lau LF (1994) Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol*, **14**, 3469-3483.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, and Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, **19**, 269-301.
- de Souza FS, Santangelo AM, Bumashny V, Avale ME, Smart JL, Low MJ, and Rubinstein M (2005) Identification of neuronal enhancers of the proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting. *Mol Cell Biol*, **25**, 3076-3086.
- de KY, Bertagna X, Lenne F, Girard F, Luton JP, and Kahn A (1985) Altered proopiomelanocortin gene expression in adrenocorticotropin-producing nonpituitary tumors. Comparative studies with corticotropic adenomas and normal pituitaries. *J Clin Invest*, **76**, 1892-1898.
- DeBold CR, Menefee JK, Nicholson WE, and Orth DN (1988) Proopiomelanocortin gene is expressed in many normal human tissues and in tumors not associated with ectopic adrenocorticotropin syndrome. *Mol Endocrinol*, **2**, 862-870.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, and Zhou MM (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Drouin J, Nemer M, Charron J, Gagner JP, Jeannotte L, Sun YL, Therrien M, and Tremblay Y (1989a) Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome*, **31**, 510-519.
- Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Eriksson P, and Wrange O (1989b) Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription DROUIN1989. *Mol Cell Biol*, **9**, 5305-5314.
- Duboule D (1994). *Guidebook to the homeobox genes*. Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press, Oxford.
- Fahrner TJ, Carroll SL, and Milbrandt J (1990) The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol*, **10**, 6454-6459.
- Feinmesser M, Asa SL, Kovacs K, and Low MJ (1992) Fine structure of adrenal cortex in rats harbouring a medullary thyroid carcinoma transfected with a corticotrophin-releasing hormone cDNA expression vector. *J Endocrinol*, **135**, 271-277.
- Fernandez PM, Brunel F, Jimenez MA, Saez JM, Cereghini S, and Zakin MM (2000) Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, **141**, 2392-2400.
- Font de MJ and Brown M (2000) AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol*, **20**, 5041-5047.
- Forman BM, Umesono K, Chen J, and Evans RM (1995) Unique response pathways are

- established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, **81**, 541-550.
- Fraser RA, Heard DJ, Adam S, Lavigne AC, Le DB, Tora L, Losson R, Rochette-Egly C, and Chambon P (1998) The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J Biol Chem*, **273**, 16199-16204.
- Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, and Rauscher FJ, III (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev*, **10**, 2067-2078.
- Fryer CJ and Archer TK (1998) Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, **393**, 88-91.
- Gagner JP and Drouin J (1987) Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, **1**, 677-682.
- Garcia-Pedrero JM, Kiskinis E, Parker MG, and Belandia B (2006) The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BAF57 is a critical regulator of estrogen receptor function in breast cancer cells. *J Biol Chem*, **281**, 22656-22664.
- Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, and Watson SJ (1983) Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature*, **306**, 374-376.
- Gehin M, Mark M, Dennefeld C, Dierich A, Gronemeyer H, and Chambon P (2002) The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol*, **22**, 5923-5937.
- Germain-Desprez D, Bazinet M, Bouvier M, and Aubry M (2003) Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem*, **278**, 22367-22373.
- Gerrero MR, McEvelly RJ, Turner E, Lin CR, O'Connell S, Jenne KJ, Hobbs MV, and Rosenfeld MG (1993) Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10841-10845.
- Gillies GE, Linton EA, and Lowry PJ (1982) Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*, **299**, 355-357.
- Glass CK (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev*, **15**, 391-407.
- Glass CK and Rosenfeld MG (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, **14**, 121-141.
- Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, and

Livingston DM (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, **300**, 342-344.

Hamamori Y, Wu HY, Sartorelli V, and Kedes L (1997) The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol Cell Biol*, **17**, 6563-6573.

Hammer GD, Fairchild-Huntress V, and Low MJ (1990) Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol*, **4**, 1689-1697.

Han YH, Cao X, Lin B, Lin F, Kolluri SK, Stebbins J, Reed JC, Dawson MI, and Zhang XK (2006) Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt. *Oncogene*, **25**, 2974-2986.

Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, Todd C, Dixon C, Sajantila A, Jackson IJ, Birch-Machin MA, and Rees JL (2000) Evidence for variable selective pressures at MC1R. *Am J Hum Genet*, **66**, 1351-1361.

Hazel TG, Misra R, Davis IJ, Greenberg ME, and Lau LF (1991) Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol Cell Biol*, **11**, 3239-3246.

Hazel TG, Nathans D, and Lau LF (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8444-8448.

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, and Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-736.

Hillebrand JJ, de WD, and Adan RA (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, **23**, 2283-2306.

Hirata Y, Kiuchi K, Chen HC, Milbrandt J, and Guroff G (1993) The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J Biol Chem*, **268**, 24808-24812.

Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, and Stallcup MR (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4948-4952.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, and Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, **88**, 131-141.

Ito M and Roeder RG (2001) The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 127-134.

Jeanmougin F, Wurtz JM, Le DB, Chambon P, and Losson R (1997) The bromodomain

revisited. *Trends Biochem Sci*, **22**, 151-153.

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

Jin WD, Boutillier AL, Glucksman MJ, Salton SR, Loeffler JP, and Roberts JL (1994) Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein. *Mol Endocrinol*, **8**, 1377-1388.

Jingami H, Nakanishi S, Imura H, and Numa S (1984) Tissue distribution of messenger RNAs coding for opioid peptide precursors and related RNA. *Eur J Biochem*, **142**, 441-447.

Jones LC, Okino ST, Gonda TJ, and Whitlock JP, Jr. (2002) Myb-binding protein 1a augments AhR-dependent gene expression. *J Biol Chem*, **277**, 22515-22519.

Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, and Rosenfeld MG (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*, **312**, 1798-1802.

Karpac J, Ostwald D, Bui S, Hunnewell P, Shankar M, and Hochgeschwender U (2005) Development, maintenance, and function of the adrenal gland in early postnatal proopiomelanocortin-null mutant mice. *Endocrinology*, **146**, 2555-2562.

Katagiri Y, Hirata Y, Milbrandt J, and Guroff G (1997) Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J Biol Chem*, **272**, 31278-31284.

Katagiri Y, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K, and Guroff G (2000) Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol*, **2**, 435-440.

Kent TA, Messina JL, Weinstock RS, and Stein JP (1994) Synergistic induction of gene 33 expression by retinoic acid and insulin. *Endocrinology*, **134**, 2237-2244.

Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, and Losson R (2004) TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem*, **279**, 48329-48341.

Kim SO, Ono K, Tobias PS, and Han J (2003) Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J Exp Med*, **197**, 1441-1452.

Kim SS, Chen YM, O'Leary E, Witzgall R, Vidal M, and Bonventre JV (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15299-15304.

Klugbauer S and Rabes HM (1999) The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid

carcinomas. *Oncogene*, **18**, 4388-4393.

Knoepfler PS and Eisenman RN (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell*, **99**, 447-450.

Koh SS, Chen D, Lee YH, and Stallcup MR (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, **276**, 1089-1098.

Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, and Arzt E (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol*, **16**, 1638-1651.

Kraus J, Buchfelder M, and Holtt V (1993) Regulatory elements of the human proopiomelanocortin gene promoter. *DNA Cell Biol*, **12**, 527-536.

Krieger DT, Liotta AS, Brownstein MJ, and Zimmerman EA (1980) ACTH, beta-lipotropin, and related peptides in brain, pituitary, and blood. *Recent Prog Horm Res*, **36**, 277-344.

Lamolet B, Poulin G, Chu K, Guillemot F, Tsai MJ, and Drouin J (2004) Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol Endocrinol*, **18**, 995-1003.

Lamolet B, Pulichino AM, 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*, **104**, 849-859.

Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, and Drouin J (1996) Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev*, **10**, 1284-1295.

Lanctot 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.

Landel CC, Kushner PJ, and Greene GL (1994) The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol Endocrinol*, **8**(10)1407-1419.

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, 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.

Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, and O'Malley BW (1992) Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol*, **6**, 2129-2135.

Le DB, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, and Chambon P (1996) A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J*, **15**, 6701-6715.

- Le DB, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, and Losson R (1995) The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J*, **14**, 2020-2033.
- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, and Vassilatis DK (2003) Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet*, **33**, 85-89.
- Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, and Rauscher FJ, III (2000) Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol*, **20**, 6449-6465.
- Lee AK and Tse A (1997) Mechanism underlying corticotropin-releasing hormone (CRH) triggered cytosolic Ca²⁺ rise in identified rat corticotrophs. *J Physiol*, **504** (Pt 2), 367-378.
- Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, and Weintraub H (1995a) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*, **268**, 836-844.
- Lee SK, Jung SY, Kim YS, Na SY, Lee YC, and Lee JW (2001) Two distinct nuclear receptor-interaction domains and CREB-binding protein-dependent transactivation function of activating signal cointegrator-2. *Mol Endocrinol*, **15**, 241-254.
- Lee SK, Kim HJ, Kim JW, and Lee JW (1999) Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol Endocrinol*, **13**, 1924-1933.
- Lee SK, Kim HJ, Na SY, Kim TS, Choi HS, Im SY, and Lee JW (1998) Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, **273**, 16651-16654.
- Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH, and Milbrandt J (1995b) Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science*, **269**, 532-535.
- Lee YH, Koh SS, Zhang X, Cheng X, and Stallcup MR (2002) Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*, **22**, 3621-3632.
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, and Patel DJ (2006) Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*, **442**, 91-95.
- Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, Lin B, Chen G, Lu J, Lin F, Xie Z, Fontana JA, Reed JC, and Zhang X (2000) Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*, **289**, 1159-1164.
- Li Y and Lau LF (1997) Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. *Endocrinology*, **138**, 4138-4146.

- Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC, and Zhang XK (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, **116**, 527-540.
- Link KA, Burd CJ, Williams E, Marshall T, Rosson G, Henry E, Weissman B, and Knudsen KE (2005) BAF57 governs androgen receptor action and androgen-dependent proliferation through SWI/SNF. *Mol Cell Biol*, **25**, 2200-2215.
- Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, and Low MJ (1992) Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. *Mol Cell Biol*, **12**, 3978-3990.
- Liu B, Mortrud M, and Low MJ (1995) DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *Biochem J*, **312** (Pt 3), 827-832.
- Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, and Osborne BA (1994) Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature*, **367**, 281-284.
- Louie MC, Zou JX, Rabinovich A, and Chen HW (2004) ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol*, **24**, 5157-5171.
- Luini A, Lewis D, Guild S, Corda D, and Axelrod J (1985) Hormone secretagogues increase cytosolic calcium by increasing cAMP in corticotropin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8034-8038.
- Lundblad JR and Roberts JL (1988) Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr Rev*, **9**, 135-158.
- Mages HW, Rilke O, Bravo R, Senger G, and Kroczeck RA (1994) NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol Endocrinol*, **8**, 1583-1591.
- Maira M, Couture C, Le MG, Pulichino AM, Bilodeau S, and Drouin J (2003a) The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 co-activators and mediates hormone action. *J Biol Chem*, **278**, 46523-46532.
- Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, and Drouin J (2003c) Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol*, **23**, 763-776.
- Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, and Drouin J (2003b) Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol*, **23**, 763-776.
- Maira M, Martens C, Philips A, and Drouin J (1999) Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol*, **19**, 7549-7557.

Mangelsdorf DJ and Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors MANGELSDORF1995. *Cell*, **83**, 841-850.

Martens C, Bilodeau S, Maira M, Gauthier Y, and Drouin J (2005) Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, **19**, 885-897.

Martin LJ and Tremblay JJ (2005) The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells. *Endocrinology*, **146**, 861-869.

Maruyama K, Tsukada T, Bandoh S, Sasaki K, Ohkura N, and Yamaguchi K (1997) Expression of the putative transcription factor NOR-1 in the nervous, the endocrine and the immune systems and the developing brain of the rat. *Neuroendocrinology*, **65**, 2-8.

Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, Bandoh S, Hosono T, and Yamaguchi K (1998) The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol*, **12**, 1237-1243.

Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P, and Aubry M (2007) Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J Biol Chem*, **282**, 10190-10202.

Masuyama N, Oishi K, Mori Y, Ueno T, Takahama Y, and Gotoh Y (2001) Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 32799-32805.

McKenna NJ, Lanz RB, and O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, **20**, 321-344.

Mednote. Cytology and Histology. Neurohypophysis. [En ligne]. 2007 [cité le 13 juin 2007]. Disponible : <http://mednote.co.kr/images/pituitary.JPG>

Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, and Gannon F (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, **115**, 751-763.

Milbrandt J (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron*, **1**, 183-188.

Millington GW (2006) Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol*, **31**, 407-412.

Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, and Spiegelman BM (2000) Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell*, **6**, 307-316.

Moosmann P, Georgiev O, Le DB, Bourquin JP, and Schaffner W (1996) Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor

domain of KOX1. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4859-4867.

Muchardt C and Yaniv M (1993) A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, **12**, 4279-4290.

Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, and Majzoub JA (1995) Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature*, **373**, 427-432.

Muglia LJ, Jacobson L, Luedke C, Vogt SK, Schaefer ML, Dikkes P, Fukuda S, Sakai Y, Suda T, and Majzoub JA (2000) Corticotropin-releasing hormone links pituitary adrenocorticotropin gene expression and release during adrenal insufficiency. *J Clin Invest*, **105**, 1269-1277.

Muller EE, Locatelli V, and Cocchi D (1999) Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev*, **79**, 511-607.

Mullis PE (2001) Transcription factors in pituitary development. *Mol Cell Endocrinol*, **185**, 1-16.

Murphy EP and Conneely OM (1997) Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the *nurr1/nur77* subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*, **11**, 39-47.

Murphy EP, McEvoy A, Conneely OM, Bresnihan B, and Fitzgerald O (2001) Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, **44**, 782-793.

Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, and Leiter AB (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 U S A*, **94**, 3560-3564.

Na SY, Lee SK, Han SJ, Choi HS, Im SY, and Lee JW (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 10831-10834.

Nakai A, Kartha S, Sakurai A, Toback FG, and DeGroot LJ (1990) A human early response gene homologous to murine *nur77* and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. *Mol Endocrinol*, **4**, 1438-1443.

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

Nemeskeri A, Setalo G, and Halasz B (1988) Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. A detailed immunohistochemical analysis. *Neuroendocrinology*, **48**, 534-543.

Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, and Losson R (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional

silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J*, **18**, 6385-6395.

Nsegebe E, Wallen-Mackenzie A, Dauger S, Roux JC, Shvarev Y, Lagercrantz H, Perlmann T, and Herlenius E (2004) Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. *J Physiol*, **556**, 43-59.

O'geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, and Farnham PJ (2007) Genome-Wide Analysis of KAP1 Binding Suggests Autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet*, **3**, e89.

Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, and Miki K (1994) Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells 1023. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 1959-1965.

Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, and O'Malley BW (1998) The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*, **273**, 12101-12108.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.

Ooi GT, Tawadros N, and Escalona RM (2004) Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol*, **228**, 1-21.

Patchev AV, Fischer D, Wolf SS, Herkenham M, Gotz F, Gehin M, Chambon P, Patchev VK, and Almeida OF (2007) Insidious adrenocortical insufficiency underlies neuroendocrine dysregulation in TIF-2 deficient mice. *FASEB J*, **21**, 231-238.

Paulsen RE, Weaver CA, Fahrner TJ, and Milbrandt J (1992) Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J Biol Chem*, **267**, 16491-16496.

Pawson AJ and McNeilly AS (2005) The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci*, **88**, 75-94.

Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, and Tontonoz P (2006) NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med*, **12**, 1048-1055.

Pekarsky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Hirata Y, Bichi R, Letofsky J, and Croce CM (2001) Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3690-3694.

Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, and Kutateladze TG (2006) Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature*, **442**, 100-103.

Peng H, Feldman I, and Rauscher FJ, III (2002) Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for

regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol*, **320**, 629-644.

Perlmann T and Jansson L (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*, **9**, 769-782.

Persani L (1998) Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin biological activity. *Thyroid*, **8**, 941-946.

Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, and Drouin J (1997a) Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells PHILIPS1997. *Mol Cell Biol*, **17**, 5946-5951.

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

Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, Chambon P, and Auwerx J (2002) SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, **111**, 931-941.

Picon A, Bertagna X, and de KY (1999) Analysis of the human proopiomelanocortin gene promoter in a small cell lung carcinoma cell line reveals an unusual role for E2F transcription factors. *Oncogene*, **18**, 2627-2633.

Ponno T, Burton Q, Pereira FA, Wu DK, and Conneely OM (2002) The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol Cell Biol*, **22**, 935-945.

Ponno T and Conneely OM (2004) nor-1 regulates hippocampal axon guidance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Mol Cell Biol*, **24**, 9070-9078.

Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, and Drouin J (2000) 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, Turgeon B, and Drouin J (1997) NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol*, **17**, 6673-6682.

Pratt WB and Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, **18**, 306-360.

Preil J, Muller MB, Gesing A, Reul JM, Sillaber I, van Gaalen MM, Landgrebe J, Holsboer F, Stenzel-Poore M, and Wurst W (2001) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. *Endocrinology*, **142**, 4946-4955.

Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, Malpuech G, Deal C, Van VG, De VM, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, and Drouin J (2003a) Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency

PULICHINO2003. *Genes Dev*, **17**, 711-716.

Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Tsai JP, Couture C, Gauthier Y, and Drouin J (2003b) Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev*, **17**, 738-747.

Qiu W, Zhuang S, von Lintig FC, Boss GR, and Pilz RB (2000) Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, **275**, 31921-31929.

Ramirez-Carrozzi VR, Nazarian AA, Li CC, Gore SL, Sridharan R, Imbalzano AN, and Smale ST (2006) Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2beta nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response. *Genes Dev*, **20**, 282-296.

Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, Zhou Y, Barut BA, Lin S, Kingsley PD, Palis J, Orkin SH, and Zon LI (2004) The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol*, **2**, E237.

Reichardt HM, Kaestner KH, 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.

Remboutsika E, Lutz Y, Gansmuller A, Vonesch JL, Losson R, and Chambon P (1999) The putative nuclear receptor mediator TIF1alpha is tightly associated with euchromatin. *J Cell Sci*, **112** (Pt 11), 1671-1683.

Reul JM and de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, **117**, 2505-2511.

Riegel AT, Remenick J, Wolford RG, Berard DS, and Hager GL (1990) A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the pro-opiomelanocortin gene. *Nucleic Acids Res*, **18**, 4513-4521.

Rosenfeld MG and Glass CK (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*, **276**, 36865-36868.

Rosenfeld MG, Lunyak VV, and Glass CK (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev*, **20**, 1405-1428.

Rowan BG, Garrison N, Weigel NL, and O'Malley BW (2000) 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol*, **20**, 8720-8730.

Ryseck RP, Donald-Bravo H, Mattei MG, Ruppert S, and Bravo R (1989) Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. *EMBO J*, **8**, 3327-3335.

Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, and Gage FH (1999) Nurr1, an orphan

nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, **126**, 4017-4026.

Samson WK, Taylor MM, and Baker JR (2003) Prolactin-releasing peptides. *Regul Pept*, **114**, 1-5.

Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, and Rauscher FJ, III (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*, **16**, 919-932.

Schultz DC, Friedman JR, and Rauscher FJ, III (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev*, **15**, 428-443.

Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, and Brown M (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, **103**, 843-852.

Singh RR, Gururaj AE, Vadlamudi RK, and Kumar R (2006) 9-cis-retinoic acid up-regulates expression of transcriptional coregulator PELP1, a novel coactivator of the retinoid X receptor alpha pathway. *J Biol Chem*, **281**, 15394-15404.

Slagsvold HH, Ostvold AC, Fallgren AB, and Paulsen RE (2002) Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 1146-1150.

Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, and Solomon S (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev*, **80**, 979-1020.

Smart JL and Low MJ (2003) Lack of proopiomelanocortin peptides results in obesity and defective adrenal function but normal melanocyte pigmentation in the murine C57BL/6 genetic background. *Ann N Y Acad Sci*, **994**, 202-210.

Smart JL, Tolle V, and Low MJ (2006) Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest*, **116**, 495-505.

Smart JL, Tolle V, Otero-Corchon V, and Low MJ (2007) Central dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *Endocrinology*, **148**, 647-659.

Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, and Lee KF (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*, **20**, 1093-1102.

Sohn YC, Kwak E, Na Y, Lee JW, and Lee SK (2001) Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional

coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77. *J Biol Chem*, **276**, 43734-43739.

Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.

Sripathy SP, Stevens J, and Schultz DC (2006) The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **26**, 8623-8638.

Suh H, Gage PJ, Drouin J, and Camper SA (2002) Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, **129**, 329-337.

Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, and Rosenfeld MG (1999) Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*, **13**, 484-494.

Takeshita A, Yen PM, Misiti S, Cardona GR, Liu Y, and Chin WW (1996) Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*, **137**, 3594-3597.

Tavner FJ, Simpson R, Tashiro S, Favier D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Macmillan EM, Lutwyche J, Keough RA, Ishii S, and Gonda TJ (1998) Molecular cloning reveals that the p160 Myb-binding protein is a novel, predominantly nucleolar protein which may play a role in transactivation by Myb. *Mol Cell Biol*, **18**, 989-1002.

Teyssier C, Ou CY, Khetchoumian K, Losson R, and Stallcup MR (2006) Transcriptional intermediary factor 1alpha mediates physical interaction and functional synergy between the coactivator-associated arginine methyltransferase 1 and glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nuclear receptor coactivators. *Mol Endocrinol*, **20**, 1276-1286.

Theodosios DT, Trailin A, and Poulain DA (2006) Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, R1175-R1182.

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.

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

Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, and Wurst W (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet*, **19**, 162-166.

Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, and Chambon P (1988) The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature*, **333**,

185-188.

Tremblay JJ 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 beta gene transcription

TREMBLAY 1999. *Mol Cell Biol*, **19**, 2567-2576.

Tremblay JJ, Goodyer CG, and Drouin J (2000) Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology*, **71**, 277-286.

Tremblay JJ, Lanctot C, and Drouin J (1998) The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), 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 JJ, 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 Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, and Drouin J (1988) Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of a proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8890-8894.

Uhler M, Herbert E, D'Eustachio P, and Ruddle FD (1983) The mouse genome contains two nonallelic pro-opiomelanocortin genes. *J Biol Chem*, **258**, 9444-9453.

Vadlamudi RK, Wang RA, Mazumdar A, Kim Y, Shin J, Sahin A, and Kumar R (2001) Molecular cloning and characterization of PELP1, a novel human coregulator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*, **276**, 38272-38279.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, and Froguel P (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*, **20**, 113-114.

Vale W, Spiess J, Rivier C, and Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, **213**, 1394-1397.

Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R, and de TH (1999) TIF1 gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene*, **18**, 1209-1217.

Vitalife Networks. [En ligne]. 2008 [cité le 13 juin 2007]. Disponible : http://www.vitalifenetworks.com/VL_Cortisol.php

Voegel JJ, Heine MJ, Tini M, Vivat V, Chambon P, and Gronemeyer H (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J*, **17**, 507-519.

Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, and Gronemeyer H (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J*, **15**, 3667-3675.

- Voogt JL (1978) Control of hormone release during lactation. *Clin Obstet Gynaecol*, **5**, 435-455.
- Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, and Stork PJ (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, **89**, 73-82.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, and Perlmann T (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, **423**, 555-560.
- Wansa KD, Harris JM, and Muscat GE (2002) The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem*, **277**, 33001-33011.
- Watanabe T and Orth DN (1987) Detailed kinetic analysis of adrenocorticotropin secretion by dispersed rat anterior pituitary cells in a microperfusion system: effects of ovine corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin. *Endocrinology*, **121**, 1133-1145.
- Watson MA and Milbrandt J (1990) Expression of the nerve growth factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development*, **110**, 173-183.
- Weber A, Toppari J, Harvey RD, Klann RC, Shaw NJ, Ricker AT, Nanto-Salonen K, Bevan JS, and Clark AJ (1995) Adrenocorticotropin receptor gene mutations in familial glucocorticoid deficiency: relationships with clinical features in four families. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 65-71.
- Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, and Refetoff S (1999) Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J*, **18**, 1900-1904.
- White A, Clark AJ, and Stewart MF (1990) The synthesis of ACTH and related peptides by tumours. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **4**, 1-27.
- White JH, Fernandes I, Mader S, and Yang XJ (2004) Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm*, **68**, 123-143.
- Williams GT and Lau LF (1993) Activation of the inducible orphan receptor gene nur77 by serum growth factors: dissociation of immediate-early and delayed-early responses. *Mol Cell Biol*, **13**, 6124-6136.
- Wilson AJ, Arango D, Mariadason JM, Heerdt BG, and Augenlicht LH (2003) TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis. *Cancer Res*, **63**, 5401-5407.
- Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, and Milbrandt J (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, **252**, 1296-1300.
- Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, and Parker KL (1993) The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol*, **13**, 861-868.
- Winnay JN, Xu J, O'Malley BW, and Hammer GD (2006) Steroid receptor coactivator-1-

deficient mice exhibit altered hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology*, **147**, 1322-1332.

Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, and Winoto A (1994) Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature*, **367**, 277-281.

Wu C (1997) Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem*, **272**, 28171-28174.

Wu RC, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW (2004) Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell*, **15**, 937-949.

Xu J and Li Q (2003) Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol*, **17**, 1681-1692.

Xu J, Liao L, Ning G, Yoshida-Komiya H, Deng C, and O'Malley BW (2000) The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6379-6384.

Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, **279**, 1922-1925.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, and Hochgeschwender U (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med*, **5**, 1066-1070.

Yu C, York B, Wang S, Feng Q, Xu J, and O'Malley BW (2007) An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell*, **25**, 765-778.

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

Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, and Perlmann T (1996) Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol*, **10**, 1656-1666.

Zhong S, Delva L, Rachez C, Cenciarelli C, Gandini D, Zhang H, Kalantry S, Freedman LP, and Pandolfi PP (1999) A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RARalpha and T18 oncoproteins. *Nat Genet*, **23**, 287-295.