



Université de Montréal

**Génomique fonctionnelle des cellules corticotropes hypophysaires:  
contrôle génétique de la gestion systémique des stress**

par

David Langlais

Programmes de Biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Biologie moléculaire

Août, 2011

© David Langlais, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

Génomique fonctionnelle des cellules corticotropes hypophysaires:  
contrôle génétique de la gestion systémique des stress

Présentée par :  
David Langlais

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Côté, président-rapporteur  
Jacques Drouin, directeur de recherche  
François Robert, membre du jury  
Jacques Corbeil, examinateur externe  
Sylvie Mader, représentant du doyen

## Résumé

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) permet de maintenir l'homéostasie de l'organisme face à divers stress. Qu'ils soient de nature psychologique, physique ou inflammatoire/infectieux, les stress provoquent la synthèse et la libération de CRH par l'hypothalamus. Les cellules corticotropes hypophysaires perçoivent ce signal et en réaction, produisent et sécrètent l'ACTH. Ceci induit la synthèse des glucocorticoïdes (Gc) par le cortex surrénalien; ces stéroïdes mettent le système métabolique en état d'alerte pour la réponse au stress et à l'agression. Les Gc ont le rôle essentiel de contrôler les défenses de l'organisme, en plus d'exercer une rétro-inhibition sur l'axe HPA.

L'ACTH est une petite hormone peptidique produite par le clivage d'un précurseur: la pro-opiomélanocortine (POMC). À cause de sa position critique dans la normalisation de l'homéostasie, le contrôle transcriptionnel du gène *Pomc* a fait l'objet d'études approfondies au cours des dernières décennies. Nous savons maintenant que la région promotrice du gène *Pomc* permet une expression ciblée dans les cellules POMC hypophysaires. L'étude du locus *Pomc* par des technologies génomiques m'a permis de découvrir un nouvel élément de régulation qui est conservé à travers l'évolution des mammifères. La caractérisation de cet enhancer a démontré qu'il dirige une expression restreinte à l'hypophyse, et plus particulièrement dans les cellules corticotropes. De façon intéressante, l'activité de cet élément dépend d'un nouveau site de liaison recrutant un homodimère du facteur de transcription Tpit, dont l'expression est également limitée aux cellules POMC de l'hypophyse. La découverte de cet enhancer ajoute une toute nouvelle dimension à la régulation de l'expression de POMC.

Les cytokines pro-inflammatoires IL6/LIF et les Gc sont connus pour leur antagonisme sur la réaction inflammatoire et sur le promoteur *Pomc* via l'action des facteurs de transcription Stat3 et GR respectivement. L'analyse génomique des sites liés



par ces deux facteurs nous a révélé une interrelation complexe et a permis de définir un code transcriptionnel entre ces voies de signalisation. En plus de leur action par interaction directe avec l'ADN au niveau des séquences régulatrices, ces facteurs interagissent directement entre eux avec des résultats transcriptionnels différents. Ainsi, le recrutement de GR par contact protéine:protéine (*tethering*) sur Stat3 étant lié à l'ADN provoque un antagonisme transcriptionnel. Inversement, le *tethering* de Stat3 sur GR supporte une action synergique, tout comme leur co-recrutement à l'ADN sur des sites contigus ou composites. Lors d'une activation soutenue, ce synergisme entre les voies IL6/LIF et Gc induit une réponse innée de défense cellulaire. Ainsi lors d'un stress majeur, ce mécanisme de défense est mis en branle dans toutes les cellules et tissus.

En somme, les travaux présentés dans cette thèse définissent les mécanismes transcriptionnels engagés dans le combat de l'organisme contre les stress. Plus particulièrement, ces mécanismes ont été décrits au niveau de la réponse globale des corticotropes et du gène *Pomc*. Il est essentiel pour l'organisme d'induire adéquatement ces mécanismes afin de faire face aux stress et d'éviter des dérèglements comme les maladies inflammatoires et métaboliques.

**Mots-clés** : POMC, Stat3, GR, tethering, CHIP-seq, microarray, hypophyse, défense, cytokine, glucocorticoïde

## Abstract

The hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis regulates homeostasis in various conditions of stress contributing to both the stress response and its termination. Psychological, physical or inflammatory/infectious stresses all prompt the synthesis and secretion of hypothalamic CRH. The pituitary corticotrope cells receive this signal and in turn, secrete ACTH which triggers the synthesis of glucocorticoids (Gc) by the adrenal cortex; these steroids induce a general state of alertness in order to fight or flight aggressions and stresses. Glucocorticoids have the critical role to restrict the stress response by exerting a negative feedback on the HPA axis.

ACTH is a small peptidic hormone produced after cleavage of a precursor protein: pro-opiomelanocortin (POMC). Due to its critical role in homeostasis, transcriptional control of the *Pomc* gene has been intensely studied during the last decades. Previous investigations identified a promoter region that is sufficient for expression of *Pomc* in the appropriate pituitary cells. Genome-wide studies of the *Pomc* locus led me to discover a novel regulatory element that is conserved throughout mammalian evolution. The activity of this enhancer is restricted to the pituitary, and more precisely to the corticotrope lineage. Interestingly, its activity depends on a novel transcription factor binding motif that binds homodimers of Tpit, a transcription factor that is only found in pituitary POMC cells. The discovery of this enhancer adds a new dimension in the control of pituitary *Pomc* expression.

The IL6/LIF pro-inflammatory cytokines and the glucocorticoids are well known for their antagonism in control of the inflammatory response; at the *Pomc* promoter, their action is mediated by the transcription factors Stat3 and GR, respectively. The analysis of genomic sites bound by these two factors revealed a complex relationship and led us to define a transcription regulatory code linking these signalling pathways. In addition to their direct DNA interaction with cognate regulatory sequences, these factors

interact with each other with different outcomes. Thus, the recruitment of GR on DNA-bound Stat3 through protein:protein contacts (tethering) results in transcriptional antagonism. Conversely, Stat3 tethering to GR produces synergism; this is also the case when the two factors are co-recruited to DNA on contiguous or composite binding sites. Prolonged activation of the IL6/LIF and Gc pathways elicits a synergistic innate cell defense response in all cells and tissues.

In summary, this doctoral work has defined transcriptional mechanisms that mediate and control the stress response. In particular, pituitary components of the stress response were defined at the level of the *Pomc* gene and as a global response of corticotrope cells. This response is critical for appropriate organism defense during stresses such as those produced in inflammatory and metabolic diseases.

**Keywords** : POMC, Stat3, GR, tethering, CHIP-seq, microarray, pituitary, defense, cytokine, glucocorticoid

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xxii</b>
<b>Chapitre 1: Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) .....	2
1.1.1. L'hypothalamus .....	3
1.1.2. L'hypophyse .....	4
1.1.2.1. Développement hypophysaire .....	5
1.1.2.2. Lobe postérieur .....	8
1.1.2.3. Lobe intermédiaire .....	9
1.1.2.4. Lobe antérieur .....	10
1.1.2.4.1. Mosaïque cellulaire .....	10
1.1.2.4.2. Les cellules corticotropes .....	14
1.1.3. Les glandes surrénales .....	16
1.1.3.1. Les glucocorticoïdes .....	17
1.1.3.2. Hypocortisolisme .....	18
1.1.3.3. Hypercortisolisme .....	19
1.2. Interface immuno-neuroendocrine .....	21
1.2.1. Cytokines pro-inflammatoires .....	21
1.2.2. Les glucocorticoïdes .....	24
1.3. Mécanismes de régulation transcriptionnelle des voies de stress .....	28
1.3.1. Les facteurs de transcription et l'ADN .....	28
1.3.2. Stat3 .....	31
1.3.2.1. La famille des Stat .....	31
1.3.2.2. Activation de la voie de signalisation de type gp130 .....	32
1.3.2.3. Structure et modifications de Stat3 .....	34
1.3.2.4. Isoformes de Stat3 .....	36

1.3.2.5. La régulation transcriptionnelle .....	37
1.3.2.6. L'inactivation de la voie Jak-Stat .....	39
1.3.3. GR .....	40
1.3.3.1. Activation du récepteur .....	41
1.3.3.2. L'activation transcriptionnelle .....	41
1.3.3.3. La répression transcriptionnelle .....	43
1.3.3.4. Transrépression versus synergie .....	44
1.3.3.5. Les actions non-génomiques .....	47
1.3.3.6. Structure du récepteur .....	48
1.3.3.7. Les différents isoformes du récepteur .....	48
1.3.3.8. Les modifications post-traductionnelles .....	52
1.3.3.9. Les ligands .....	53
1.4. L'ACTH et son précurseur .....	55
1.4.1. Régulation transcriptionnelle histospécifique du gène de la POMC .....	55
1.4.2. Contrôle hormonal du gène de la POMC .....	59
1.4.2.1. Activation par la corticolibérine .....	60
1.4.2.2. Activation par LIF .....	62
1.4.2.3. Répression par les glucocorticoïdes .....	64
1.5. Hypothèses et objectifs .....	66
<b>Chapitre 2 : A Pituitary-Specific Enhancer of the POMC Gene with Preferential Activity in Corticotrope Cells.....</b>	<b>68</b>
2.1. Avant-propos .....	69
2.1.1. Publication .....	69
2.1.2. Contribution des auteurs .....	69
2.1.3. Contexte .....	69
2.2. Summary .....	71
2.3. Introduction .....	72
2.4. Results .....	75
2.4.1 A candidate regulatory element in the POMC locus.....	75
2.4.2 The -7kb region has typical enhancer properties .....	75
2.4.3. Enhancer activity is highly dependent on a palindromic Tpit binding site... 77	
2.4.4. The -7kb POMC enhancer exhibits preference for anterior pituitary corticotropes .....	79
2.4.5. Species differences in POMC regulatory sequences.....	80
2.5. Discussion .....	82
2.6. Materials and methods .....	86
2.6.1. Cell culture and transfection .....	86
2.6.2. Reporter constructs.....	86

2.6.3. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and QPCR.....	87
2.6.4. Binding motif analyses.....	88
2.6.5. Electromobility shift assay.....	88
2.6.6. Transgenic mice.....	89
2.6.7. Immunofluorescence and cell counts.....	89
2.7. Footnotes.....	90
Acknowledgements.....	90
Funding.....	90
Disclosure statement.....	90
2.8. References.....	91
2.9 Figure Legends.....	95

### **Chapitre 3 : Regulatory Network Analyses Reveal Genome-Wide Potentiation of LIF Signaling by Glucocorticoids and Define an Innate Cell Defense Response .....110**

3.1. Avant-propos.....	111
3.1.1. Publication.....	111
3.1.2. Contribution des auteurs.....	111
3.1.3. Contexte.....	111
3.2. Summary.....	113
3.3. Author summary.....	114
3.4. Introduction.....	115
3.5. Results.....	118
3.5.1. LIF/STAT3 target genes.....	118
3.5.2. STAT3 binding sites preferentially localize close to transcribed sequences.....	119
3.5.3. Reciprocal co-potentiation of STAT3 and GR recruitment to genomic target sites.....	120
3.5.4. Synergistic action of LIF and glucocorticoids.....	121
3.5.5. Cell response to stress is activated by joint action of LIF and Gc.....	122
3.5.6. Lipocalin 2, a highly LIF- and glucocorticoid-dependent gene.....	123
3.6. Discussion.....	126
3.6.1. Mechanism of STAT3 action.....	126
3.6.2. Potentiation of LIF action by Gc.....	128
3.6.3. Inhibition of cell cycle and mitosis by glucocorticoids.....	128
3.6.4. The cell defense response.....	129
3.7. Materials and methods.....	131
3.7.1. Cell culture and transfection.....	131

3.7.2. Western blots.....	131
3.7.3. Chromatin immunoprecipitation (ChIP), sequential ChIP and QPCR.....	131
3.7.4. Whole-genome tiling arrays.....	132
3.7.5. Binding motif analyses.....	132
3.7.6. RNA and expression arrays.....	133
3.7.7. Clustering and Gene Ontology analysis.....	133
3.7.8. <i>In vivo</i> experiments.....	134
3.8. Footnotes.....	135
Acknowledgements.....	135
Funding.....	135
Disclosure statement.....	135
3.9. References.....	136
3.10. Figure Legends.....	142

## **Chapitre 4: The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome.....156**

4.1. Avant-propos.....	157
4.1.1. Publication.....	157
4.1.2. Contribution des auteurs.....	157
4.1.3. Contexte.....	157
4.2. Summary.....	159
Highlights.....	159
4.3. Introduction.....	160
4.4. Results.....	162
4.4.1. Independent genome recruitment of Stat3 and GR.....	162
4.4.2. Stat3 and GR recruitment through protein tethering.....	163
4.4.3. Transcriptional activation by Stat3 or GR.....	164
4.4.4. GR antagonism of Stat3-dependent transcription.....	165
4.4.5. Synergism between Stat3 and GR.....	166
4.4.6. GR-tethered Stat3 enhances transcription.....	168
4.5. Discussion.....	170
4.6. Materials and Methods.....	174
4.6.1. Cell culture, reporters and transfections.....	174
4.6.2. Flag-Stat3 and Flag-GR cell populations.....	174
4.6.3. Western blots.....	175
4.6.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and QPCR.....	175
4.6.5. ChIP-seq library preparation, sequencing and analysis.....	175
4.6.6. Expression profiling data.....	176

4.7. Footnotes .....	177
Acknowledgements .....	177
Funding. ....	177
Disclosure statement. ....	177
4.8. References .....	178
4.9. Figure Legends.....	183
4.10. Supplementary Materials and Methods.....	194
4.10.1. ChIP-seq peak finding analysis.....	194
4.10.2. <i>De novo</i> motif analyses .....	194
4.10.3. Transcription factor binding motifs searches.....	195
4.11. Supplementary Figure Legends .....	196
4.12. Supplementary References.....	208
<b>Chapitre 5: Discussion et perspectives.....</b>	<b>209</b>
5.1. Contrôle transcriptionnel du gène de la POMC .....	209
5.1.1. Contrôle de l'expression histospécifique.....	210
5.1.1.1. NeuroD1 .....	211
5.1.1.2. Pitx1 et Tpit.....	212
5.1.2. Rôle de l'enhancer .....	216
5.1.3. Déficit isolé en ACTH .....	219
5.1.4. Activation par LIF .....	220
5.1.5. Transrépression par les glucocorticoïdes .....	225
5.2. Réponse innée de défense cellulaire .....	230
5.2.1. Réminiscence d'une réponse ancestrale .....	230
5.2.2. Mécanisme d'activation de la réponse innée de défense cellulaire .....	231
5.3. Les différentes chorégraphies du couple Stat3-GR .....	235
5.4. Conclusions générales.....	240
<b>6. Bibliographie .....</b>	<b>242</b>



## Liste des tableaux

Table 3.S1.: List of genomic STAT3 binding regions selected for a $P$ value threshold of $10^{-5}$ after analysis with MAT algorithm (Mouse mm7 assembly).....	146
Table 3.S2.: List of LIF and/or glucocorticoid regulated genes. ....	146
Table 3.S3.: List of gene annotations attributed by DAVID web site for each cluster. ....	146
Table 3.S4.: Gene Ontology analyses of the 9 gene clusters. ....	146
Table 4.S2. Stat3 and GR ChIP-seq binding peak list (p value threshold $\leq 10^{-8}$ ), related to Figure 1. ....	196
Table 4.S3. Oligonucleotides used for luciferase reporter constructs, related to Figure 5. ....	196
Table 4.S1.: Stat3 and GR ChIP-seq experiments summary. ....	200
Table 5.1.: Position des éléments de régulation et données de ChIP-seq pour le promoteur <i>Pomc</i> .....	223

## Liste des figures

Figure 1.1.: Principales glandes endocrines.....	2
Figure 1.2.: Organisation de l'unité hypothalamo-hypophysaire. ....	4
Figure 1.3.: Schéma de différenciation des cellules endocrines dans l'hypophyse embryonnaire. ....	6
Figure 1.4.: Hormones pituitaires et leurs principaux tissus cibles.....	13
Figure 1.5.: Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA).....	15
Figure 1.6.: Les différentes zones des glandes surrénales. ....	17
Figure 1.7.: Symptômes du syndrome de Cushing .....	20
Figure 1.8.: Architecture et cascade d'activation de la voie gp130-Jak-Stat.....	34
Figure 1.9.: Représentation schématique des différents modes de régulation transcriptionnelle de GR. ....	43
Figure 1.10.: Différents isoformes du récepteur aux glucocorticoïdes. ....	50
Figure 1.11.: Dérivés de la POMC créés par clivages protéolytiques. ....	55
Figure 1.12.: Facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression histospcifique et hormonal de la <i>Pomc</i> . ....	59
Figure 2.1. Identification of a novel POMC regulatory region.....	100
Figure 2.2. The -7kb POMC conserved region has enhancer properties. ....	101
Figure 2.3. Enhancer activity is dependent on palindromic Tpit binding site (TpitREpal). ....	102
Figure 2.4. Activation of luciferase reporter constructs by Tpit in Tpit-deficient mouse $\alpha$ T3 cells. ....	103
Figure 2.5. Tpit dimers bind the TpitREpal <i>in vitro</i> . ....	104
Figure 2.6. Preferential activity of -7kb enhancer transgene in corticotropes compared to promoter bias towards melanotropes. ....	105

Figure 2.7. Properties of human -7kb POMC enhancer.....	106
Figure 2.S1. Activity of the POMC promoter and/or -7kb enhancer upon lipofection into the indicated cell lines.....	107
Figure 2.S2. Sequence alignments for POMC -7kb enhancer TpitREpal and promoter Tpit/PitxRE.....	108
Figure 2.S3. Extended comparison of sequence conservation in species for which DNA sequences of the POMC locus is available.....	109
Figure 3.1. Targets of LIF/STAT3 action.....	147
Figure 3.2. STAT3 genomic binding sites.....	148
Figure 3.3. Potentiation of STAT3 and GR recruitment at a subset of LIF/STAT3 target genes.....	149
Figure 3.4. Identification of LIF and glucocorticoids regulated genes.....	150
Figure 3.5. Clustering analysis of LIF and Dex regulated genes.....	151
Figure 3.6. Highly synergistic activation of the lipocalin 2 ( <i>Lcn2</i> ) gene by LIF and glucocorticoids.....	152
Figure 3.7. <i>In vivo</i> regulation of LIF and glucocorticoids dependent genes.....	153
Figure 3.S1: List of 91 genes from cluster #2 with known/suspected cell defense function.....	154
Figure 4.1.: Different modalities of Stat3 and GR recruitment to genomic loci.....	187
Figure 4.2.: Correlation between transcriptional outcome and Stat3/GR recruitment schemes.....	188
Figure 4.3.: Position of transcription factor binding peaks relative to target genes with different hormone response patterns.....	189
Figure 4.4.: DNA-independent recruitment of GR to Stat3 targets.....	190
Figure 4.5.: A novel composite regulatory element containing Stat3 and GR binding motifs.....	191
Figure 4.6.: DNA-independent recruitment of Stat3 to GR targets.....	192

Figure 4.7.: Schematic representation of various schemes of Stat3 and GR genomic recruitment correlated with hormone response and transcriptional outcome. ....	193
Figure 4.S1.: Search for <i>de novo</i> or canonical sequence motifs around peaks of each cluster of Stat3 and/or GR binding scheme. ....	201
Figure 4.S2.: Peak heights for Stat3 and GR ChIP-seq peaks in various hormone conditions. ....	202
Figure 4.S3.: Distribution of Stat3 and/or GR binding peaks of each cluster type relative to TSS of associated Dex responsive genes. ....	203
Figure 4.S4.: Detailed analysis of AtT-20 cells stably expressing Flag-GR or mutant Flag-GR (Flag-GRm). ....	204
Figure 4.S5.: SGRE composite regulatory element binding and response properties. .	205
Figure 4.S6.: ChIP-seq profiles for genes that are subject to synergistic activation by LIF and Dex treatment. ....	206
Figure 4.S7.: Detailed analysis of Stat3 tethering to GR. ....	207
Figure 5.1.: Profil d'enrichissement des ChIP-chip Tpit, Pitx1, NeuroD1, Stat3 et RNA PolII sur le locus <i>Pomc</i> . ....	211
Figure 5.2.: Profil de ChIP-seq sur le locus <i>Pomc</i> . ....	214
Figure 5.3.: Recrutement de C/EBP $\beta$ au promoteur <i>Pomc</i> . ....	225
Figure 5.4.: Représentation amendée des facteurs de transcriptions impliqués dans le contrôle de l'expression histospécifique et hormonal de la <i>Pomc</i> . ....	229
Figure 5.5.: Analyse préliminaire des médiateurs secondaires potentiellement responsables de l'activation de l'ICDR. ....	234

## Liste des sigles et abréviations

### A

aa	acide aminé
ACTH	"adrenocortical-stimulating hormone" (corticotrophine)
ADH	hormone anti-diurétique ou vasopressine
ADN	acide désoxyribonucléique
AL ou LA	"anterior lobe" (lobe antérieur)
AR	récepteur des androgènes
ARN	acide ribonucléique
AtT-20	atomic test 20 (lignée cellulaire de type corticotrope)
AVP	vasopressine

### B

BAC	"bacterial artificial chromosome"
bHLH	"basic-helix-loop-helix"
Bmp	"bone morphogenic protein"
BRG1	Brahma-related gene 1

### C

CBP	"CREB-binding protein"
C/EBP	"CCAAT enhancer-binding protein"
ChIP	immunoprécipitation de chromatine
ChIP-chip	ChIP hybridée sur micropuces d'ADN
ChIP-seq	séquençage à haut débit de ChIP
CRH	"corticotrophin releasing hormone" (corticolibérine)
CRHR	récepteur de la CRH

### D

DBD	"DNA binding domain" (domaine de liaison à l'ADN)
Dex	dexaméthasone
Dnmt	"DNA methyl transferase"

### E

e	jour embryonnaire
eGFP	"enhanced green fluorescence protein"
ER	récepteur des œstrogènes
ES	"embryonic stem cells" (cellules souches embryonnaires)

**F**

Fgf "Fibroblast growth factor"  
FSH "follicle-stimulating hormone" (follitropine)

**G**

Gc glucocorticoïdes  
GH "growth hormone" (hormone de croissance)  
GR récepteur des glucocorticoïdes  
GRE "GR Response Element" (élément de réponse à GR)

**H**

HAT histone acétyl-transférase  
HDAC histone déacétylase  
HPA "hypothalamic-pituitary-adrenal axis" (axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien)

**I**

IAD "isolated ACTH deficiency" (Déficit isolé en ACTH)  
ICDR "innate cell defense response" (Réponse innée de défense cellulaire)  
IL ou LI "intermediate lobe" (lobe intermédiaire)  
IL1 interleukine 1  
IL6 interleukine 6  
IRES "internal ribosome entry site"

**J**

Jak Janus kinase

**K**

Kb kilobases

**L**

LBD	"ligand binding domain" (domaine de liaison du ligand)
Lcn2	lipocaline 2
LCR	"locus control region" (région de contrôle de locus)
LH	"luteinizing hormone" (Lutropine)
Lhx	"LIM homeobox"
LIF	"leukemia inhibitory factor"
Luc	luciférase

**M**

MAPK	"mitogen activated protein kinase"
Mc	minéralocorticoïdes
MC2R	récepteur de l'ACTH
miR	"microRNA"
MR	récepteur des minéralocorticoïdes
mRNA	"messenger RNA" (ARN messenger)
Mt	methallothionein

**N**

NBRE	"NGFI-B Response Element" (élément de réponse à NGFI-B)
NF- $\kappa$ B	"nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
nGRE	"negative GR Response Element" (élément de réponse négative à GR)
NLS	"nuclear localisation signal" (signal de localisation nucléaire)
nPE1/2	"neuronal POMC enhancer 1 or 2" (enhancer hypothalamique de POMC)
NPV	noyau paraventriculaire
NR	"nuclear receptor" (récepteur nucléaire)
NSC	noyau suprachiasmique
NurRE	"Nur Response Element" (élément de réponse aux facteurs Nur)

**O**

OT	ocytocine
----	-----------

**P**

pb ou bp	paire de base
PC	pro-protéine convertase
PCR	"polymerase chain reaction"
PI3K	"phosphoinositide 3-kinase"
Pitx	"pituitary homeobox"
PolII	ARN polymérase II
POMC	pro-opiomélanocortine
PRL	"prolactin" (prolactine)
Prop1	"prophet of Pit-1"

**R**

RT	"reverse transcriptase"
----	-------------------------

**S**

SF1	"steroidogenic factor 1"
SGRE	"Stat3-GR response element"
Shh	"Sonic hedgehog"
siRNA	"small interfering RNA"
SNC	système nerveux central
Socs	"suppressor of cytokine signalling"
SRC	"steroid receptor coactivator"
STAT	"signal transducer and activator of transcription"



**T**

TAD	"transactivation domain" (domaine de transactivation)
TBP	"TATA-binding protein"
Tbx	"Tbox factor" (facteur à boîte T)
TFBS	"transcription factor binding site" (site de liaison de facteur de transcription)
TLR	"Toll-like receptor"
TNF $\alpha$	"Tumor necrosis factor alpha"
Tpit	"pituitary T-box" (aussi connu comme Tbx19)
Tpit/PitxRE	"Tpit/Pitx Response Element" (élément de réponse à Tpit/Pitx)
TpitREpal	"palindromic Tbox response element" (élément palindromique de réponse à Tpit)
TR	récepteur de l'hormone thyroïdienne
TRH	"thyrotropin releasing hormone"
TSH	"thyroid-stimulating hormone" (thyrotropine)
TSS	"transcription start site" (site d'initiation de la transcription)

**U**

UTR	"untranslated region" (région non-traduite)
-----	---

En hommage à mes frères disparus

*Quo fas et gloria ducunt*

*Ubique!*

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Jacques Drouin, pour toutes les années que j'ai passées dans son laboratoire. Je suis vraiment reconnaissant de la latitude qu'il m'a laissé dans l'élaboration et la poursuite de mes projets. Rares sont les chefs qui nous donnent autant de corde, suffit de ne pas l'utiliser pour se pendre. Nos discussions scientifiques furent souvent animées, mais toujours agréables et prolifiques. Je voulais également le remercier pour les nombreux congrès nationaux et internationaux auxquels il m'a permis de participer. J'ai pu élargir ma connaissance du monde et mes connaissances scientifiques. Merci Jacques!

Je suis également gré de l'aide de plusieurs collaborateurs chevronnés. Premièrement, l'écriture de mes manuscrits a été grandement facilitée grâce à l'aide experte de Lise Laroche. Les soumissions en sa compagnie furent toujours un moment trépidant. Les services spécialisés de l'IRCM ont également été d'un grand service, je pense à Annie Vallée et Geneviève Brindle qui ont tranché mes hypophyses et embryons, à Dominic Filion au service de microscopie, à l'excellent service d'Antoine Enfissi qui m'a permis de valider les séquences des nombreux plasmides que j'ai générés et plus particulièrement Odile Neyret, directrice du service de biologie moléculaire avec qui j'ai eu une collaboration productive et enrichissante.

Je ne pourrais passer sous silence l'aide inestimable de Johanne Duhaime. Tes connaissances bioinformatiques, mais surtout ton enthousiasme et ton intérêt m'ont permis de mener à bien ces travaux de doctorat. Je suis certain que nous aurons encore le plaisir de collaborer.

Catherine Couture, bien plus qu'une collègue, tu es devenue une amie. Je ne pourrai jamais te remercier assez pour toute l'aide que tu m'as apportée durant toutes ces années, et aussi pour tous les fous rires que nous avons eus. MERCI!!

Je tiens également à remercier les membres de ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel et les bons moments. Karine, Véro, Marc et Étienne, je suis choyé d'avoir des amis comme vous!

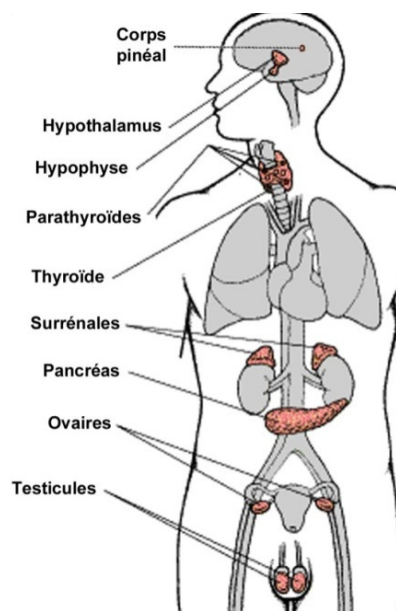
Enfin, merci à toi mon amour, d'avoir toujours été à mes côtés et de m'avoir supporté. Mylène, sans toi ça aurait été impossible. Tu as été compréhensive et aimante, en plus de me donner les 2 plus beaux cadeaux. Je t'aime! Vincent et Antoine, Papa vous aime!

## Chapitre 1: Introduction

Le fonctionnement des organismes unicellulaires comme les bactéries ou les levures est complexe et compte plusieurs mécanismes leur permettant de se nourrir, se reproduire, mais également de s'adapter à leur environnement. Au fil de l'évolution, des organismes pluricellulaires se sont formés et des cellules ont acquis des fonctions plus spécialisées. Ce regroupement et cette spécialisation apporte un défi d'autant plus grand aux organismes plus complexes dont nous faisons partie: l'intégration de toutes ces fonctions pour créer un tout cohérent. Tout bon leader vous dira que la clé de voûte pour y parvenir c'est la communication! La nature, ayant compris cela bien avant nous, a créé deux moyens de communication qui sont essentiels à notre fonctionnement et notre survie. Le premier est le système nerveux, qui nous permet de réfléchir mais surtout de régler finement les fonctions de l'organisme, tel que les battements cardiaques, la respiration, les mouvements musculaires, etc. Le second qui est parfois laissé pour compte, mais il est néanmoins vital: le système endocrinien. Ces deux systèmes sont loin de fonctionner indépendamment. Ils travaillent plutôt de façon synergique, et ce malgré leur vitesse d'exécution incroyablement différente. Alors que les organes/cellules cibles reçoivent les influx nerveux en quelques millisecondes, le système endocrinien communique par l'entremise d'hormones, de petites molécules ou peptides relâchés dans le sang par des organes spécialisés dans leur production appelés glandes. La rapidité de réponse des organes/cellules cibles varie selon le message de quelques secondes à plusieurs minutes. En outre, les effets de ces hormones se perpétuent à plus long terme.

Les principaux tissus endocriniens sont: l'hypothalamus, l'hypophyse, la thyroïde, la parathyroïde, le thymus, les glandes surrénales, le pancréas, les gonades (testicules ou ovaires) et le corps pinéal (Figure 1.1). L'étude de ce système, soit l'endocrinologie, nous aide à comprendre le rôle de chacune des hormones produites par ces glandes. Cette branche de la recherche demeure extrêmement active, malgré qu'elle roule sa bosse depuis la fin du 19<sup>e</sup> siècle. Depuis la découverte de l'insuline en 1922, elle profite de l'avancement des technologies en recherche pour accroître notre compréhension des systèmes endocriniens, ce qui est d'autant plus vrai aujourd'hui. En plus des maladies génétiques

provoquant des dérèglements hormonaux, les maladies métaboliques engendrées par notre mode de vie effréné, l'inactivité physique et une alimentation déséquilibrée nous montrent bien que les différentes hormones ne fonctionnent pas en vases clos, et que ces interrelations complexes sont très mal comprises. Le stress est un des principal mal-être de nos sociétés industrialisées. Les dérèglements biologiques qu'il provoque engendrent des coûts importants, qu'ils soient de nature personnelle, sociale, médicale ou financière. Cet ouvrage apporte une lumière nouvelle sur les mécanismes systémiques et génomiques dont dispose notre organisme pour le contrôle des stress.



**Figure 1.1.: Principales glandes endocrines**

### **1.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA)**

Les différents stress imposés à l'organisme, qu'ils soient physiques, psychologiques ou infectieux/inflammatoires, doivent être promptement contrôlés pour éviter que l'organisme ne s'emballé, ce qui pourrait dans bien des cas provoquer la mort. Cette tâche ultime est remplie par une sous-unité majeure du système neuroendocrinien, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (ci-après appelée l'axe HPA). Comme son nom

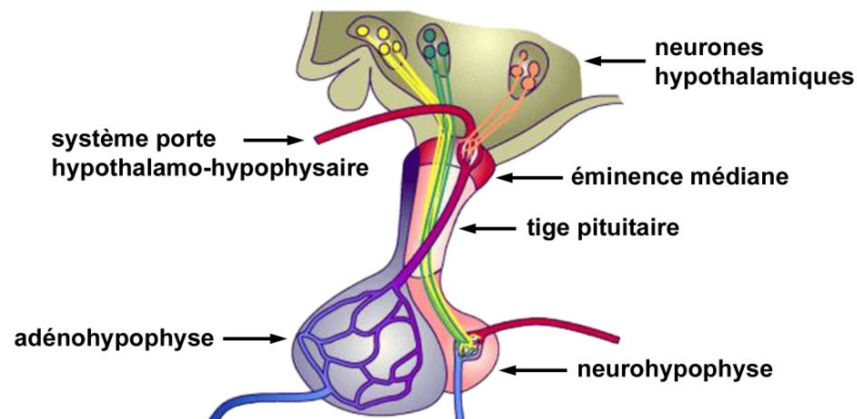
l'indique, il s'agit d'un axe de communication constitué de l'hypothalamus, de l'hypophyse et des glandes surrénales (Figure 1.3). En plus d'être en charge de la régulation des stress, il participe également à plusieurs autres processus biologiques importants, incluant l'action du système immunitaire, la digestion, l'humeur, la sexualité et l'utilisation de l'énergie. Des dérèglements de cet axe ont été associés à plusieurs pathologies, tel que l'anxiété, la bipolarité, la dépression, les troubles de fatigue chronique, le syndrome de stress post-traumatique, etc. Une atteinte majeure à cet axe provoque des maladies beaucoup plus graves: déficit isolé en ACTH, maladie d'Addison ou syndrome de Cushing.

### **1.1.1. L'hypothalamus**

L'hypothalamus est un regroupement de neurones situés dans la partie ventrale du diencephale qui sert de centrale d'intégration et de relais entre le système nerveux et le système endocrinien. Ses diverses connections avec le système nerveux central lui permettent de coordonner des informations hormonales, métaboliques, circadiennes et nerveuses. Le corps cellulaire des neurones hypothalamiques sont regroupés en structures appelées noyaux. À partir de ces noyaux, les neurones impliqués dans la régulation de l'hypophyse projettent leurs axones vers deux régions distinctes: soit vers le lobe postérieur de l'hypophyse ou vers l'éminence médiane (Figure 1.2). Cette dernière est irriguée par l'artère hypophysaire supérieure qui s'ouvre ensuite sur le système porte hypophysaire et inonde le lobe antérieur de l'hypophyse. Ce réseau ultradéveloppé de capillaires se situe à l'extérieur de la barrière hémato-encéphalique et constitue le site privilégié de relâche des hormones hypothalamiques par les neurones parvocellulaires. Les principales hormones hypothalamiques sont:

- Thyrolibérine (Thyrotropin-releasing hormone, TRH) : elle active la sécrétion de TSH et PRL par les cellules thyrotropes et lactotropes, respectivement.

- Gonadolibérine (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) : elle régule la relâche de la FSH et LH par les cellules gonadotropes hypophysaires.
- Somatolibérine (Growth-hormone-releasing hormone, GHRH) : elle induit le relargage d'hormone de croissance (GH) par les somatotropes.
- Corticolibérine (Corticotropin-releasing-hormone, CRH) : peptide de 41 aa produit par des neurones du noyau paraventriculaire qui induit la production et la libération de corticotropine (ACTH).
- Somatostatine : elle inhibe la production et la sécrétion de plusieurs hormones hypophysaires (principalement GH et TSH), en plus de se rétro-inhiber.



**Figure 1.2.: Organisation de l'unité hypothalamo-hypophysaire.**  
(Adapté de <http://histoblog.viabloga.com>)

### 1.1.2. L'hypophyse

Cette petite glande, mais néanmoins complexe, se situe à la base du cerveau dans la selle turcique de l'os sphénoïde. Autrefois appelée glande pituitaire, elle est souvent considérée comme la glande "maîtresse". Cette appellation retrouve ses fondements parce



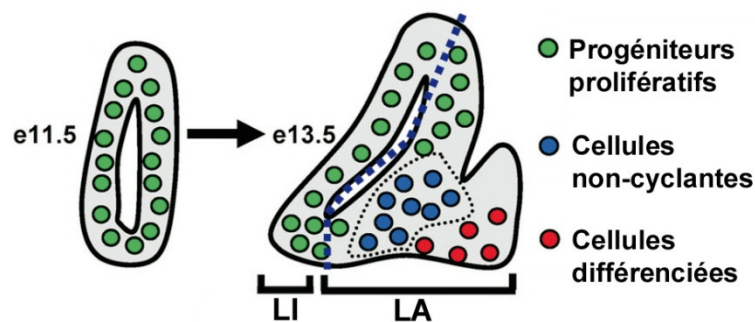
que son action, via les différentes hormones qu'elle produit, contrôle la majorité des autres glandes de l'organisme. Loin d'être asservie par l'hypothalamus, elle est en contact étroit avec celui-ci; que ce soit par le tractus hypothalamique qui se prolonge dans la neurohypophyse ou bien via l'organe de communication humoral qu'est le système porte hypophysaire (Figure 1.2). Ainsi l'hypophyse réagit promptement aux signaux hypothalamiques, mais également aux multiples signaux extérieurs lui parvenant par la circulation sanguine ou de façon paracrine. Chez la majorité des espèces de mammifères, l'hypophyse est constituée de 3 lobes: le lobe postérieur, le lobe intermédiaire et le lobe antérieur.

#### **1.1.2.1. Développement hypophysaire**

Le lobe intermédiaire (ou *pars intermedia*), tout comme le lobe antérieur (*pars distalis*), prend son origine développemental de l'ectoderme oral. Des signaux morphogéniques (Bmp2, Bmp4, Fgf8, Fgf10 et Shh) délimitent, induisent et entretiennent l'invagination d'une région de l'ectoderme oral qui se trouve en contact avec le tissu diencéphalique présomptif (l'infundibulum qui deviendra le lobe postérieur et l'hypothalamus). Cette invagination qui débute vers le 9<sup>e</sup> jour de gestation chez la souris, est appelée poche de Rathke. Par la suite, la poche de Rathke se referme sur elle-même et perd son lien avec l'ectoderme oral. Une orchestration complexe de facteurs de transcription (FT) est induite pour permettre l'expansion et le développement de la poche de Rathke. Parmi ces FT, les *pituitary homeobox* (Pitx1 et Pitx2) sont exprimés de façon très précoce. L'inactivation de ces deux gènes dans un modèle de souris bloque de développement hypophysaire (1). Le développement est arrêté au même stade par l'inactivation concomitante de deux autres FT à homéodomaines (Lhx3 et Lhx4), dont l'expression dépend des Pitx (2;3). Suite à la fermeture de la poche, la partie ventrale qui deviendra le lobe antérieur subit une phase de prolifération intensive ainsi qu'une transition épithélium-mésenchyme qui est essentielle à la différenciation des cellules endocrines. Le FT Prop1 est

important à cette transition. Par contre, même après son invalidation chez la souris, un petit nombre de cellules effectue la transition et réussit à se différencier (4;5).

Les cellules progénitrices en prolifération sont localisées en périphérie de la lumière de la glande qui est une réminiscence de la fermeture de la poche de Rathke (Figure 1.3). Préalablement à la différenciation, les progéniteurs sortent du cycle cellulaire par l'expression de l'inhibiteur de cycle p57 (6). Après cette étape de transition importante, p57 est remplacé par p27, un autre inhibiteur de cycle de la même famille. Dans la région ventrale de la glande, les premières cellules différenciées apparaissent vers e13.5, les cellules corticotropes étant les pionnières (Figure 1.3). L'expression de p27 est maintenue dans toutes les cellules endocrines de la glande tout au long de l'âge adulte. La perte de cette expression provoque la prolifération de cellules différenciées et des tumeurs hypophysaires (6;7).



**Figure 1.3.: Schéma de différenciation des cellules endocrines dans l'hypophyse embryonnaire.**  
(Adapté de (6))

Le développement subséquent de l'adénohypophyse est caractérisé par une augmentation rapide de la taille de la glande et par l'apparition de 5 types de cellules endocrines: les corticotropes, les thyrotropes, les somatotropes, les lactotropes et enfin les gonadotropes qui apparaissent en dernier. Il a été démontré que des cellules de type progénitrices hypophysaires sont maintenues chez l'adulte. Le marqueur moléculaire qui les caractérise est l'expression du FT Sox2. Lorsqu'elles sont mises en culture, ces cellules

positives pour l'expression de Sox2 peuvent se différencier en tous les types de cellules endocrines (8). Également, la perte d'un allèle fonctionnel de Sox2 chez l'homme et la souris provoque l'hypopituitarisme et des altérations majeures des axes endocriniens (9). Ces cellules progénitrices sont donc d'une importance capitale durant le développement de la glande et lors de l'expansion de certaines populations cellulaires en réaction à des demandes physiologiques importantes, comme la lactation, la puberté ou une surrénalectomie. Le taux de renouvellement et la provenance des nouvelles cellules du lobe antérieur durant la période post-natale est un sujet qui est toujours controversé aujourd'hui, malgré des décennies d'études. Cette méconnaissance est probablement due au manque d'outils appropriés pour suivre ces phénomènes extrêmement lents. À la suite de travaux que j'ai effectués mais qui ne sont pas inclus dans cette thèse, je peux affirmer que le mécanisme de renouvellement normal des cellules corticotropes est par la mitose de cellules corticotropes déjà différenciées. Je suis arrivé à cette conclusion grâce au croisement de souris exprimant la Cre recombinase spécifiquement dans les cellules POMC hypophysaires (corticotropes et mélanotropes) sous le contrôle du promoteur *Pomc* avec une lignée de souris contenant deux sites *loxP* inversés sur le chromosome 2. Cette dernière lignée fut développée par le groupe de la Dre Marie Kmita de l'IRCM. La recombinaison de ces sites par la Cre provoque une instabilité chromosomique et la mort des cellules qui tentent de se divisées. Dans ce contexte où la Cre n'est exprimée que dans les cellules POMC différenciées, une perte lente et cumulative des cellules corticotropes est observée. Ceci révèle donc que le mécanisme principal de renouvellement des cellules corticotropes est par la prolifération de cellules déjà différenciées (données non publiées). Ainsi les cellules matures peuvent provenir de deux sources différentes en fonction de la situation, soit une repopulation normale du pool de cellules ou par un apport soutenu de nouvelles cellules durant le développement embryonnaire ou une demande physiologique.

### 1.1.2.2. Lobe postérieur

Le lobe postérieur ou neurohypophyse n'est pas constitué de cellules endocrines à proprement parler. Il est principalement composé de cellules gliales (pituicytes) et de terminaisons axonales de l'hypothalamus. Ces terminaisons proviennent des neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Ceux-ci produisent respectivement la vasopressine (ADH) et l'ocytocine (OT) au niveau hypothalamique, pour ensuite les emmagasiner dans le lobe postérieur en attente d'un signal de relâche (10).

Le contrôle de la concentration et du volume sanguin est un processus extrêmement important. Des neurones hypothalamiques, nommés osmorécepteurs, mesurent constamment cette concentration. Lorsqu'elle devient trop élevée, ces neurones envoient un signal qui engendre la synthèse et la relâche de vasopressine (ou hormone anti-diurétique) dans le sang. Celle-ci agit sur les tubules rénaux qui en réaction récupèrent plus d'eau de l'urine en formation. Cette eau est réintroduite dans la circulation sanguine. Le phénomène inverse se produit lorsque la concentration sanguine est trop faible. Il est à noter que certains médicaments ou substances naturelles interfèrent avec les effets de l'ADH, comme l'alcool qui produit une diurèse excessive. Cette hormone a également un fort potentiel de vasoconstriction, d'où le nom vasopressine. En effet, lors d'une hémorragie, de grandes quantités d'ADH sont libérées dans le sang pour contrer la perte du volume sanguin par la constriction des muscles lisses artériels (10). L'ADH a également un rôle au niveau des cellules endocrines hypophysaires en stimulant la relâche d'ACTH et de TSH (11).

L'OT est une hormone très importante pour la reproduction chez la femme. Sa libération est stimulée par des signaux nerveux majoritairement. Au moment de l'accouchement, l'OT est relâchée en grande quantité suite aux influx indiquant une dilatation du col de l'utérus. Vers la fin de la grossesse, le nombre de récepteur d'OT dans les muscles utérins augmente de façon significative, ainsi lors de sa libération par les neurones du lobe postérieur, elle induit les contractions utérines menant à l'enfantement. De façon similaire, les influx nerveux envoyés par les mamelons quand le bébé commence à

téter provoquent la libération d'OT. Subséquemment, les muscles lisses des glandes mammaires se contractent et provoquent l'expulsion du lait, communément appelé le réflexe d'éjection du lait. Outre ces fonctions importantes reliées à la gestation, jusqu'à tout récemment les fonctions de l'ocytocine étaient plutôt nébuleuses. Il semblerait que cette hormone soit à l'origine de la sensation de satisfaction suite à une excitation sexuelle ou affective, mais également de comportement sociaux comme l'attachement maternel et la mémoire sociale (12).

### **1.1.2.3. Lobe intermédiaire**

Le lobe intermédiaire (LI) a la même origine embryonnaire que le lobe antérieur, mais en est séparé histologiquement par la lumière hypophysaire. De plus, il est considéré comme un tissu plutôt uniforme puisqu'il ne contient qu'un seul type de cellules endocrines, les mélanotropes. L'inactivation du gène *Tpit* par le laboratoire a démontré qu'il est nécessaire à la différenciation terminale des mélanotropes (13;14). Dans ces souris mutantes, la majorité des cellules du LI sont au rendez-vous, mais demeurent dans un état non différencié et hors du cycle cellulaire (p57 positives) (6). Quelques cellules réussissent tout de même à se différencier en mélanotropes et d'autres changent de destin et deviennent des gonadotropes. Nous avons récemment identifié le premier marqueur spécifique des cellules mélanotropes, le FT Pax7. L'inactivation de celui-ci nous a montré qu'il agit en aval de *Tpit* pour spécifier le caractère particulier des mélanotropes, malgré que Pax7 soit exprimé légèrement plus précocement. En effet, en son absence, les cellules du LI acquièrent des caractéristiques corticotropes. Pax7 agit donc à titre de gène sélecteur de l'identité mélanotrope (Budry *et al.*, non publié).

Le lobe intermédiaire est présent chez la majorité des mammifères. Malgré que cette structure se développe durant l'embryogénèse humaine, à partir de la 15<sup>e</sup> semaine de gestation elle subit une involution dont on retrouve des petites masses cellulaires qui s'insèrent partiellement dans le lobe postérieur (15); il a aussi été suggéré que certaines

cellules d'origine intermédiaire s'intègrent dans le lobe antérieur. Si le lobe intermédiaire a une fonction fœtale chez l'humain, elle demeure toujours inconnue.

Les mélanotropes produisent principalement la mélanocortine (*alpha-melanocyte-stimulating hormone*,  $\alpha$ -MSH) et la  $\beta$ -endorphine grâce au clivage de la pro-opiomélanocortine (POMC) par les pro-protéines convertases PC1 et PC2. L' $\alpha$ -MSH est relâchée dans la circulation sanguine suite à une innervation directe du lobe intermédiaire par des neurones dopaminergiques hypothalamiques (16). Par contre, en comparaison avec les lobes postérieur et antérieur, ce tissu est très peu irrigué par des capillaires sanguins. Les actions physiologiques connues de l' $\alpha$ -MSH sont majoritairement médiées suite à sa liaison avec le récepteur MC1R. Chez les mélanocytes de la peau, elle induit la production de mélatonine et ainsi contrôle la pigmentation de la peau et des poils. Il a également été proposé qu'elle exercerait un effet anti-inflammatoire grâce à la présence de son récepteur sur les leucocytes (17).

#### **1.1.2.4. Lobe antérieur**

Le lobe antérieur (LA) ou adénohypophyse est le lien essentiel dans la régulation de la majorité des processus biologiques. Il reçoit les signaux trophiques qui sont déversés par l'hypothalamus dans l'éminence médiane vers le système porte hypophysaire (Figure 1.2). L'imposant réseau de capillaire qui parcourt le LA revêt une importance capitale pour sa fonction. Il lui permet d'envoyer ses commandements hormonaux vers la circulation périphérique qui sont ultimement reçus par les tissus cibles, mais aussi de recevoir des signaux extérieurs, venant par exemple du système immunitaire.

##### ***1.1.2.4.1. Mosaïque cellulaire***

Afin de jouer le rôle critique de régulation qui lui incombe, le LA s'est doté de 5 types de cellules endocrines, en proportion et en fonctions variées:

- **Thyréotropes** : Il s'agit du type cellulaire le moins abondant, car il constitue moins de 5% de l'adénohypophyse. Les thyrotropes produisent et relâchent dans la circulation sanguine la thyrotropine (TSH) suite à la réception de la TRH hypothalamique sur leur récepteur à la TRH (TRHR). La TSH induit à son tour la libération des hormones  $T_3$  et  $T_4$  par la glande thyroïde. Alors que la  $T_4$  est produite par les follicules thyroïdiens, la majeure partie de la  $T_3$  est produite dans le tissu cible à partir de la  $T_4$ . Les hormones thyroïdiennes ont une fonction primordialement calorigène, c'est-à-dire qu'elles accélèrent le métabolisme cellulaire et augmentent la consommation d'oxygène pour ainsi accroître la production de chaleur. L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien constitue donc le principal thermostat de l'organisme. Il agit également en concertation avec l'hormone de croissance (GH) pour influencer la croissance et le développement des tissus.

- **Somatotropes** : En opposition aux thyrotropes, les cellules somatotropes représentent environ 50% de la glande. Elle libèrent l'hormone de croissance (GH) sous le contrôle positif de la GHRH hypothalamique. Bien que la GH active la croissance et la division de la majorité des types cellulaires, son effet primaire réside dans l'induction de la sécrétion de la somatomédine (IGF-1) par le foie. Cette dernière médie l'effet de la GH en favorisant la croissance, principalement des muscles et des os (Figure 1.4). Pour éviter une surproduction de GH et donc d'IGF-1, ce qui résulte en acromégalie, ces deux hormones exercent une action de rétro-inhibition sur les neurones productrices de GHRH et directement sur les somatotropes. La balance du taux de GH est très importante durant la croissance des enfants, sinon il en résulte du nanisme ou du gigantisme.

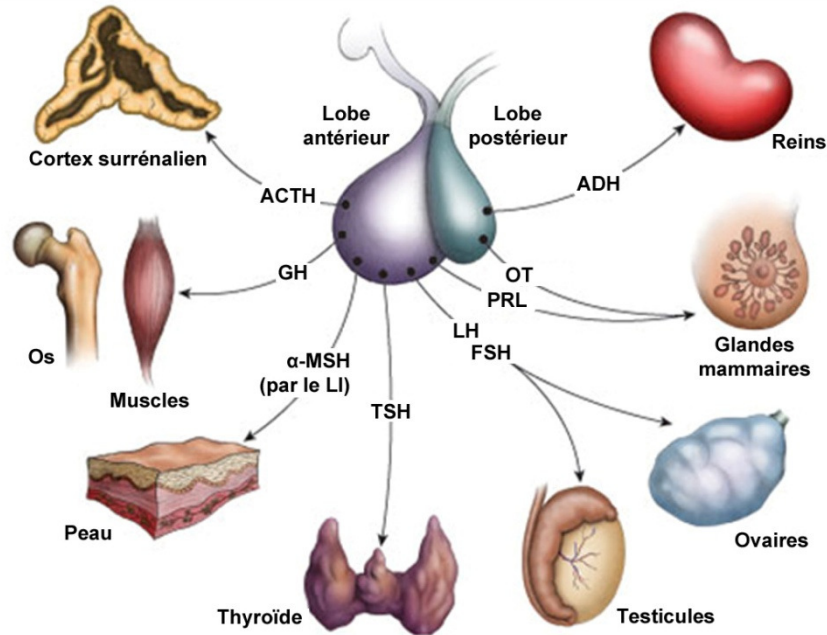
- **Lactotropes** : Les cellules lactotropes produisent et sécrètent la prolactine (PRL) qui permet d'activer la production de lait par les glandes mammaires (Figure 1.4). Leur proportion peut varier durant la vie d'une femelle, allant de 10% en condition normale, jusqu'à 30% durant la gestation et la période de lactation. La sécrétion de PRL est sous contrôle négatif de la dopamine et positif de plusieurs facteurs hypothalamiques (ex: TRH,

OT, ADH, galanine, etc.) regroupés sous le nom PRF, pour *prolactin-releasing factors*. La tétée du bébé, de même que les œstrogènes participent à l'induction de la production de PRL. Le haut niveau de PRL sanguin durant la période d'allaitement prévient les ovulations, ce qui permet au corps de la mère de concentrer ses énergies sur le/les nouveau(x)-né(s) plutôt que sur une nouvelle grossesse.

- **Gonadotropes** : La plupart des cellules gonadotropes produisent les gonadotropines FSH et LH, mais il ne s'agit pas d'une population homogène. En effet, certaines gonadotropes ne produisent qu'une des deux hormones. Le rôle de ces sous-populations est inconnu. La gonadolibérine hypothalamique (GnRH) active la production de la LH et FSH qui exercent ensuite une boucle de rétroaction négative sur les neurones hypothalamiques afférents, en plus d'agir sur les gonades (Figure 1.4). Chez l'homme, l'hormone lutéinisante (LH) favorise la production de testostérone par les cellules interstitielles des testicules, tandis que l'hormone folliculo-stimulante (FSH) encourage la spermatogenèse en ciblant les cellules de Sertoli de concert avec la testostérone. Chez la femme, la sécrétion des gonadotropines varie en fonction du cycle ovarien (qui est en moyenne de 28 jours). La FSH agit de façon synergique avec la LH pour induire la maturation d'un follicule ovarien par cycle. Au 14<sup>e</sup> jour, un pic de sécrétion de LH provoque l'ovulation. Elle stimule la production d'œstrogène et de progestérone qui rétro-inhibe l'axe.

- **Corticotropes** : Ayant la position centrale de l'axe HPA, les cellules corticotropes produisent l'adrénocorticotropine (ACTH) qui induit la synthèse de glucocorticoïdes par les glandes surrénales (Figure 1.4). Les Gc exercent une pléiades d'actions biologiques en plus de rétro-inhiber l'axe HPA (Figure 1.5). Elles représentent environ 5-10% des cellules endocrines du LA. Les corticotropes font l'objet d'une description détaillée dans la section suivante.





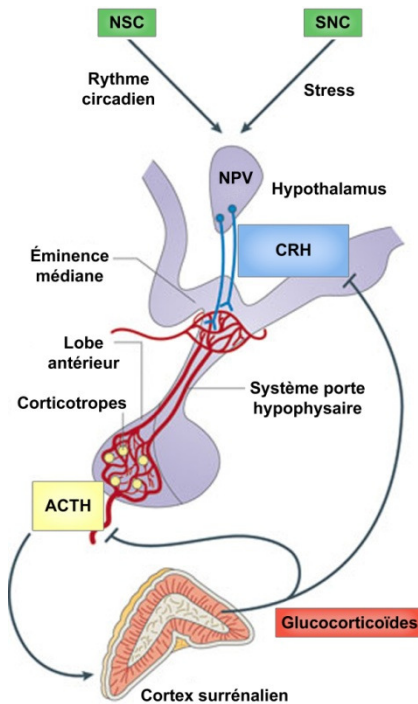
**Figure 1.4.: Hormones pituitaires et leurs principaux tissus cibles**  
(Adapté de [www.pituitary.me.uk](http://www.pituitary.me.uk))

Depuis longtemps, l'organisation du LA est discutée. Les propositions vont d'un mélange plus ou moins hétérogène, jusqu'à une concentration localisée des différents types de cellules endocrines. Par contre, ces interprétations ont été basées sur l'analyse de coupes histologiques au niveau mid-sagittal, ce qui donne une vue assez biaisée et incomplète de la distribution globale. Grâce à des analyses tridimensionnelles effectuées sur des glandes complètes de souris transgéniques, nous savons désormais que les somatotropes forment un réseau continu connecté par des jonctions adhérentes (18). Les contacts homotypiques qui relient les cellules GH (imagées par GH-GFP) entre elles leur permettent de réagir de façon synchronisée à la GHRH hypothalamique et ainsi sécréter des doses massives de GH, ce que des cellules isolées n'arrivent pas à faire. Il peut paraître trivial que toutes les cellules GH se touchent puisqu'elles représentent 50% des cellules endocrines, mais il semble bien qu'il en soit autrement. Effectivement, en collaboration avec le groupe du Dr Mollard à Montpellier, notre laboratoire a démontré que les cellules corticotropes (identifiées par l'expression d'un transgène EGFP étant sous le contrôle du promoteur POMC) forment

également un réseau homotypique de cellules. Ce réseau se met en place précocement au cours du développement (vers e15.5). Nous avons également démontré que ce réseau de cellules POMC est en étroite intimité avec un réseau de cellules gonadotropes (LH-Cer). De plus, ces réseaux forment des contacts privilégiés avec le réseau de capillaires, ce qui permet présumément un relargage efficace et concerté des hormones (19).

#### ***1.1.2.4.2. Les cellules corticotropes***

Les cellules corticotropes produisent et sécrètent l'ACTH en réponse à de multiples stimuli, mais plus particulièrement à la corticolibérine hypothalamique (CRH). Celle-ci est relâchée dans le système porte hypophysaire de façon pulsatile et en fonction du rythme circadien (Figure 1.5). En situations critiques, les signaux de stress sont intégrés par les neurones du noyau paraventriculaire, et alors ils procèdent à une relâche soutenue de CRH qui supplante les signaux pulsatiles. Les cellules corticotropes reçoivent ce messenger peptidique via leur récepteur au CRH (CRHR). En retour, elles synthétisent la POMC qui est maturée en ACTH. Parallèlement, elles libèrent l'ACTH qui était emmagasinée dans leurs vésicules de sécrétion. La vasopressine agit en synergie avec la CRH sur la sécrétion de l'ACTH, mais ne semble pas avoir d'effet sur sa production (20). L'ACTH est détectée par le récepteur MC2R dans les glandes surrénales qui répondent en augmentant la synthèse des glucocorticoïdes et les relargant dans la circulation. Tel que décrit plus loin, les Gc ont des effets biologiques majeurs et diversifiés qui visent à inhiber les sources de stress et ainsi amener un retour à l'homéostasie. De plus, les Gc exercent une boucle rétro-inhibitrice sur l'axe HPA, tant au niveau hypothalamique que corticotrope, réduisant alors la sécrétion de CRH et d'ACTH (Figure 1.5). Les effets de l'ACTH ne se limitent pas à la stéroïdogénèse: elle est également le principal agent trophique des cellules du cortex surrénalien. Ainsi, en cas d'excès d'ACTH, le cortex devient hyperplasique alors qu'il s'atrophie lors d'un déficit (21).



**Figure 1.5.: Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA)**  
(Adapté de (22))

Le rôle principal des cellules corticotropes est d'agir à titre d'usine de production de POMC. La transcription histospécifique de ce gène critique pour la biologie des corticotropes est contrôlée par plusieurs FT. *Tpit*, *Pitx* et *NeuroD1* sont également impliqués dans l'apparition développementale des corticotropes. Ainsi *Pitx1*, de concert avec *Pitx2*, est essentiel au développement précoce de la glande. Le rôle de *NeuroD1* est encore mal défini, mis à part un léger retard dans la différenciation des corticotropes révélé par son invalidation. Son effet réel est possiblement masqué par d'autres FT de type bHLH neurogéniques (23;24). Par ailleurs, les études de génétique murine nous ont montré que le FT *Tpit* a un rôle crucial dans la différenciation terminale des cellules corticotropes et mélanotropes. Ceci a pu être démontré grâce à l'insertion d'un gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase dans le locus *Tpit* lors de son invalidation. Ainsi, les cellules destinées à devenir corticotropes ou mélanotropes sont présentes (expriment la  $\beta$ -gal), mais n'ont pas

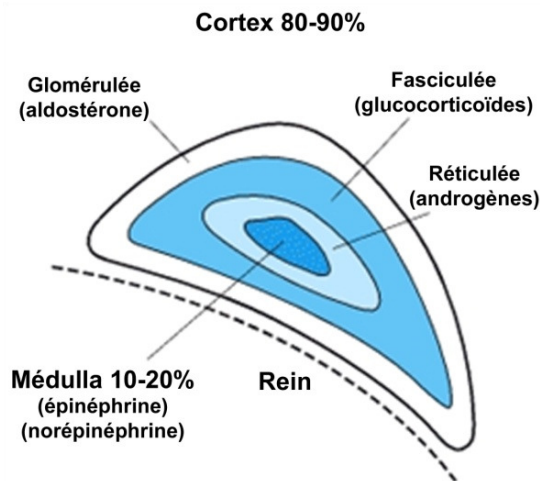
réussi à allumer le gène *Pomc*. En conséquence, la quasi absence de production d'ACTH provoque une hypoplasie des surrénales et une absence de corticostérone sanguin.

La perte d'expression d'ACTH chez l'humain provoque une maladie très rare, le déficit isolé congénital en ACTH (IAD) (25). Cette maladie dont les signes cliniques n'ont été bien décrit que récemment, est caractérisée par des taux d'ACTH très bas causant une insuffisance surrénalienne et une hypoglycémie néonatale, tout en conservant intactes les autres fonctions hypophysaires (25). Donc si le diagnostic et la thérapie de remplacement par des Gc ne sont pas rapidement effectués, le patient décède. La majorité des cas de IAD néonataux (65%) ont été associés à des mutations dans le gène *TPIT*. Jusqu'à maintenant 21 différentes mutations de *TPIT* ont été identifiées dans 29 familles non-apparentées ((25-27) et Couture C. *et al.*, JCEM, soumis).

### 1.1.3. Les glandes surrénales

Les glandes surrénales sont soumises à un contrôle hormonal complexe imposé par l'axe HPA, mais également par des signaux extérieurs, tel que des cytokines pro-inflammatoires et l'angiotensine. Ces glandes essentielles au maintien de l'homéostasie sont au nombre de 2. De forme pyramidale, chacune pèse entre 4 et 6 grammes chez l'adulte et est située au dessus des reins. Elle est composée principalement de deux parties d'origine embryonnaire différente, soit la médulla et le cortex. La médulla représente environ 10%-20% des surrénales et est constituée principalement de cellules chromaffines provenant de cellules de la crête neurale. Leur fonction est de produire et sécréter l'épinephrine et la norépinephrine (ou adrénaline et noradrénaline, respectivement) (Figure 1.6). La majeure partie de la glande, le cortex, est formée durant l'embryogenèse à partir de cellules mésenchymales de la cavité coelomique. Le cortex est divisé en trois zones distinctes par leur histologie et les stéroïdes qu'elles produisent. À l'extérieur on retrouve la zone glomérulée qui produit les minéralocorticoïdes, dont le principal stéroïde est l'aldostérone. La partie intérieure qui borde la médulla est appelée zone réticulée. Elle est le site de

production des androgènes surrénaliens, dont le déhydroépiandrostérone (DHEA) est le représentant majoritaire. La zone fasciculée nous intéresse plus particulièrement dans cette étude. Elle représente environ 75% du cortex et est localisée entre les zones glomérulée et réticulée (28).



**Figure 1.6.: Les différentes zones des glandes surrénales.**  
(Adapté de (29))

### 1.1.3.1. Les glucocorticoïdes

La zone fasciculée est responsable de la production des glucocorticoïdes, dont les deux principaux, le cortisol et la corticostérone, sont produits à différents niveaux selon l'espèce. L'humain sécrète majoritairement du cortisol (ratio 7:1), contrairement à une production quasi exclusive de corticostérone chez les rongeurs (28). Il est intéressant de noter que la corticostérone a une activité glucocorticoïde 3 fois inférieure à celle du cortisol, mais a une activité minéralocorticoïde 15 fois supérieure. Par opposition, le glucocorticoïde synthétique Dexaméthasone (Dex) qui est couramment utilisé pour des traitements médicaux, a une activité exclusivement glucocorticoïde qui est 25 fois supérieure à celle du cortisol (28). Le cortisol libéré dans la circulation sanguine est à 75% lié au CBG (*corticosteroid binding globulin*) et environ 15% à l'albumine. La forme plasmatique libre du cortisol (ou corticostérone) correspond à la forme biologiquement active. Globalement,

la demi-vie du cortisol se situe entre 60 et 90 minutes, à cause de sa métabolisation par le foie. L'activité biologique des Gc est médiée par le récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes (GR). En présence de Gc, celui-ci se rend dans le noyau pour contrôler l'expression d'un ensemble spécifique de gènes cibles, soit en les activant ou les réprimant. Les différentes actions transcriptionnelles des Gc/GR seront discutées à la section 1.3.

L'axe HPA suit le rythme circadien, donc chez l'humain les niveaux de Gc circulants sont à leur maximum tôt le matin et au minimum vers minuit (30). En plus d'obéir au rythme circadien, l'axe induit une sécrétion pulsatile de Gc avec une périodicité d'environ 1h (31). Cette relâche pulsatile des Gc naturels induit des cycles d'association de GR avec l'ADN pour contrôler la transcription, suivi d'une dissociation et du relargage du ligand, une réassociation avec les protéines chaperonnes au niveau du noyau ce qui permet au ligand de se réassocier avec GR et ainsi être recruté à l'ADN de nouveau (32). Il a été démontré que ce cyclage rapide sur des éléments de réponse aux Gc (GRE) permet d'induire le recrutement des histones acétylases CBP/p300 et de la machinerie transcriptionnelle, et ainsi activer la production d'ARNm. La relâche pulsatile des Gc permet une régulation beaucoup plus fine de l'expression génique, puisque expérimentalement, une exposition continue aux mêmes concentrations de Gc naturels provoquent une transcription beaucoup plus soutenue (31). La majorité des hormones sont sécrétées suivant un patron similaire, alors même si toutes les implications biologiques sont encore mal connues, cela permet certainement un contrôle pointu des voies de signalisation qu'elles régulent. Plus particulièrement dans le cas des Gc, elle permet d'avoir un récepteur disponible et réactif à des sécrétions incrémentielles de Gc dues à des situations de stress.

### **1.1.3.2. Hypocortisolisme**

Outre les patients atteints de IAD, un faible taux de Gc circulant (hypocortisolémie) est généralement relié à une insuffisance surrénalienne causée par une destruction auto-immunitaire. Cette maladie a été nommée maladie d'Addison en l'honneur de son

découvreur, Thomas Addison. Les symptômes associés à cette perte de Gc sont : perte de poids, hypoglycémie, hypotension, réaction inflammatoire augmentée, fatigue chronique, etc. La perte de rétroaction négative sur l'axe HPA provoque une augmentation de la sécrétion d'ACTH ce qui cause une hyperpigmentation. La maladie d'Addison est relativement rare (~50 cas par million de personnes) et peut se contrôler aisément en restaurant les niveaux de Gc sanguins par une source exogène.

### 1.1.3.3. Hypercortisolisme

Williams Harvey Cushing est considéré comme le "père de la neurochirurgie moderne". Dans un article paru en 1932, il a décrit les signes cliniques d'un patient montrant une hypercortisolémie qu'il a attribué à une tumeur hypophysaire. Les causes de l'hypercortisolisme (syndrome de Cushing) sont multiples et sont généralement regroupées en 2 classes:

#### Causes ACTH-dépendantes (~75% des cas)

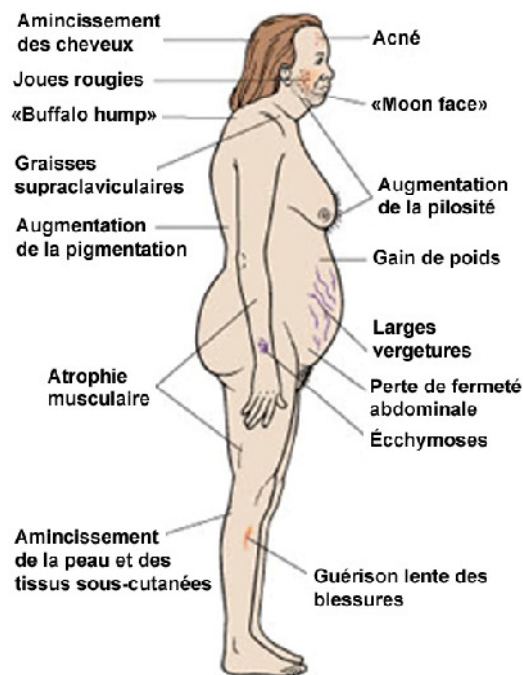
- une tumeur hypophysaire sécrétant l'ACTH, cette forme est normalement appelée maladie de Cushing et représente environ 70% de la totalité des cas;
- une tumeur ectopique sécrétant de l'ACTH; et
- une tumeur sécrétant de la CRH.

#### Causes ACTH-indépendantes (~25% des cas)

- une tumeur surrénalienne ou ectopique sécrétant des Gc; et
- une prise excessive de Gc exogènes.

Les Cushing ACTH-dépendants ont évidemment des taux très élevés d'ACTH sanguin qui induisent une production massive de Gc. Normalement, la production d'ACTH serait inhibée par la présence de Gc, mais la perte de rétro-inhibition hypophysaire par les Gc est caractéristique de cette classe. Chez la seconde classe, les Gc ne proviennent pas du cortex surrénalien normal: la production de POMC est donc réprimée et les taux d'ACTH

sanguin sont très bas. Les symptômes de ce syndrome sont présentés à la figure 1.7. L'hypersécrétion de Gc résulte principalement en une redistribution facio-tronculaire des graisses, une atrophie musculaire et des membres, un amincissement de la peau et des cheveux, une fragilité des capillaires causant des ecchymoses, de larges vergetures, de l'ostéoporose, de l'hypertension, un taux de cholestérol élevé, du diabète, de même qu'une augmentation de la sensibilité aux infections. Dans certains cas, des troubles psychiatriques s'en suivent. L'administration systémique à long terme de Gc lors de traitements anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs induit des effets secondaires similaires au syndrome de Cushing (33). Le seul traitement efficace contre la maladie de Cushing consiste à retirer la tumeur hypophysaire responsable de ce dérèglement, car l'ablation des surrénales abaisse effectivement les niveaux de Gc mais il en résulte souvent un accroissement de la tumeur (syndrome de Nelson). Par contre, l'exérèse des tumeurs hypophysaires est difficile et les taux de récives sont élevés.



**Figure 1.7.: Symptômes du syndrome de Cushing**  
(Adapté des Éditions Mosby Inc., 2000)



## **1.2. Interface immuno-neuroendocrine**

L'axe HPA est responsable du contrôle des stress qu'ils soient de nature physique ou psychologique, mais également inflammatoire et infectieux. Le système immunitaire et l'axe HPA s'influencent mutuellement. Lors d'une infection, les cellules du système immunitaire relâchent dans la circulation sanguine des cytokines pro-inflammatoires qui activent l'axe HPA à différents niveaux. Premièrement, les neurones hypothalamiques perçoivent ces cytokines, majoritairement TNF $\alpha$ , IL1 et LIF/IL6, et induisent la production/libération de CRH. La corticolibérine induit à son tour la production/libération d'ACTH par les cellules corticotropes (34). La transcription du gène *Pomc* est activée synergiquement par la CRH et les interleukines LIF/IL6 qui agissent directement sur les cellules corticotropes. La synthèse de Gc par le cortex des surrénales est également activée directement par LIF/IL6. En plus de leur rétro-inhibition sur l'axe, les Gc ainsi libérés exercent une action anti-inflammatoire directement sur les cellules de l'immunité. Cette action permet d'éviter que le système immunitaire ne s'emballe et provoque des effets délétères pour l'organisme, comme de l'auto-immunité, des dommages tissulaires importants ou un choc septique (35-37). Les influences mutuelles entre ces deux systèmes importants sont regroupés sous l'appellation d'interface immuno-neuroendocrine (38).

### **1.2.1. Cytokines pro-inflammatoires**

Les cytokines constituent un grand groupe de polypeptides pléiotropiques, dont l'action biologique est partiellement redondante pour certains d'entre eux. La majorité des tissus expriment des niveaux constitutifs, mais faibles de ces cytokines. Ces niveaux sont rapidement augmentés en réponse à des blessures, des infections et l'inflammation. Leur action est dépendante de la présence de leur récepteur transmembranaire respectif sur les tissus cibles. Il existe une forte concentration de ces récepteurs dans l'hypothalamus, l'hypophyse et les surrénales. De plus, l'expression de ces récepteurs augmente en réponse aux signaux de stress (39). Ceci suggère fortement une action directe des cytokines pro-inflammatoires sur l'axe HPA.

Une infection ou une injection de lipopolysaccharides bactériens (LPS, qui miment une infection par des bactéries Gram -) provoque l'activation diligente de la réponse immunitaire innée. Grâce aux récepteurs de reconnaissance de molécules du non-soi (PRR; *Pattern Recognition Receptors*), les phagocytes mononuclés (macrophages, monocytes et cellules dendritiques) détectent les molécules étrangères. Ces phagocytes activés sécrètent rapidement TNF $\alpha$  et IL1 $\alpha/\beta$  pour donner le signal d'alarme et mettre en branle le système immunitaire (40). Parallèlement, elles phagocytent et fragmentent les pathogènes pour permettre la présentation de ces antigènes étrangers aux cellules T. La reconnaissance des antigènes active les cellules T et engendre leur production d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ). Cet IFN $\gamma$  complète l'activation des phagocytes mononuclés et soutien la production/sécrétion de cytokines pro-inflammatoires secondaires, tel que LIF et IL6. En réponse aux signaux inflammatoires, tous les niveaux de l'axe HPA produisent localement LIF/IL6. Certaines cellules de l'hypophyse peuvent également produire LIF/IL6 en répondant directement à la présence de LPS (41). Cette régulation auto/paracrine s'ajoute aux cytokines circulantes pour amplifier et maintenir l'activation de l'axe lors d'infections majeures et/ou chroniques. L'ensemble de ces cytokines ont un très fort potentiel pro-inflammatoire et puisqu'elles ont des fonctions parfois redondantes et qu'elles s'entre régulent les unes les autres, il est souvent difficile de départager leurs fonctions. Par contre, il est évident qu'elles agissent en synergie sur l'axe, puisque l'activation n'est que partielle en réponse à chacune d'entre elles (42). Bien que le dogme veut que la CRH soit le signal primordial dans l'activation de l'axe HPA, les cytokines pro-inflammatoires sont au moins aussi importantes. En effet, les souris déficientes en CRH ou CRHR1 ont une production d'ACTH et de Gc très atténuée en réponse à des stress d'ordre psychologiques ou métaboliques, mais une activation quasi-normale de l'axe HPA suite à des stress infectieux (43;44).

Plusieurs modèles de souris déficientes (KO) ont été développés au fil des années pour nous aider à mieux comprendre le rôle des différentes cytokines dans le contrôle de l'interface immuno-neuroendocrine. Les souris KO pour IL1 $\alpha/\beta$  ou IL6 ont une réponse normale de l'axe HPA après 1h, mais cette activation ne persiste pas puisqu'elle est

fortement réduite 6-8h post-stimulation/infection (45-47). Puisque IL1 induit la production d'IL6, il a été suggéré que les effets d'IL1 sur l'axe soit plutôt médiés par IL6 (48). Les évidences qui émanent de ces souris KO tendent à dire que l'interleukine 1 peut agir par lui-même au niveau de l'hypothalamus (IL6 également), mais qu'IL6 serait son médiateur au niveau corticotrope et surrénalien (47;49). La surexpression de LIF dans l'hypophyse en développement provoque une altération du patron développemental en favorisant la différenciation corticotrope, créant ainsi une surabondance d'ACTH circulant et engendrant des symptômes similaires au syndrome de Cushing (50). De plus, l'inactivation du gène *Lif* réduit de façon critique la réponse aux stress de l'axe HPA, tant au niveau de la transcription de *Pomc*, qu'au niveau de la sécrétion d'ACTH et de corticostérone (51;52). L'administration de LIF chez des souris préalablement à une infection majeure prévient un choc septique léthal et les dommages tissulaires dus à une septicémie. Donc, LIF et les autres cytokines de la réponse immunitaire innée, ont une importance capitale dans la réaction de l'organisme aux divers stress qui nous affligent.

En plus de l'activation de l'axe HPA et de l'activation proprement dite des cellules du système immunitaire, l'augmentation rapide de la concentration sanguine de ces cytokines affecte d'autres processus pour aider à contrôler l'infection. Capitalement, elles (majoritairement IL6) induisent la phase de réponse aigue (APR, *acute phase response*). Cette réponse faisant partie intégrale de l'immunité innée se caractérise par une augmentation de la température interne (la fièvre), l'augmentation du nombre de leucocytes, l'induction des mécanismes de défense non-spécifiques, des changements de la réponse métabolique et de la perméabilité vasculaire (53). Tous ces changements rapides permettent de créer un environnement inhospitalier pour les pathogènes et favoriser leur éradication. Un des éléments les plus caractéristiques de l'APR est la production massive par le foie de protéines de phase aigue. Ces protéines relâchées dans la circulation sanguine ont diverses fonctions antimicrobiennes ou activatrice de l'immunité. Par exemple, la lipocaline 2 (*Lcn2*) est un chélateur de fer. Pour leur survie et leur multiplication, les bactéries ont besoin de fer. Afin d'en faciliter l'absorption, elles sécrètent de petites protéines adaptatrices

(sidérophores) qui dérobent le fer des protéines de transport du fer de l'hôte (transferrine et ferritine, qui sont également induites durant l'APR). La lipocaline 2 vient interférer dans ce processus en liant les sidérophores, donc elle prévient l'absorption du fer par les bactéries. Les souris déficiente en *Lcn2* ne parviennent pas à contrôler l'infection et meurent rapidement (54;55). Il a été démontré à l'aide de souris dont *Stat3* a été invalidé conditionnellement dans le foie, qu'il est essentiel à l'activation de l'APR par IL6 ou une infection (injection LPS). Par ailleurs, il est important de noter que les Gc produits en réaction aux cytokines pro-inflammatoires, participent également à l'activation des gènes de la réponse APR (56;57). Le chapitre 3 ci-après fait état d'un nouveau mécanisme de défense pléiotropique activé dans la majorité des tissus par l'action synergique des voies LIF/IL6 et Gc.

Les maladies métaboliques de nos sociétés modernes sont caractérisées par des dérèglements multiples de nos processus de maintien homéostatique. La majorité de ces affections ont une forte composante inflammatoire. L'expression chronique de niveaux anormalement élevés de cytokines est reliée à plusieurs pathologies inflammatoires, dont des allergies, des maladies auto-immunitaires, l'asthme, l'arthrite, la maladie de Crohn, une prédisposition aux maladies cardiovasculaires, etc. Plusieurs maladies inflammatoires sont traitées (ou plutôt contrôlées) par la prise de Gc exogènes. Par contre, une exposition prolongée aux Gc n'a pas que des effets bénéfiques, comme il en a été question dans la section 1.1.3. Ainsi de nouvelles avenues sont explorées pour trouver des traitements plus spécifiques. Par exemple, l'injection de Tocilizumab, un inhibiteur spécifique du récepteur à IL6, ne diminue pas seulement les symptômes chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde à surexpression d'IL6, mais prévient également la destruction des articulations (58).

### **1.2.2. Les glucocorticoïdes**

Lorsque l'homéostasie de l'organisme est menacée, les Gc orchestrent de nombreux changements métaboliques qui permettent de surmonter cet assaut. Plus particulièrement,

ils permettent de mobiliser l'énergie emmagasinée qui sera utilisée par les tissus importants à la survie, principalement le cœur et le cerveau. Par contre, l'exposition prolongée à des taux élevés de Gc a été associée au syndrome métabolique qui est caractérisé par de l'obésité, l'hypertension, la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie, une dyslipidémie et une immunosuppression. Ces effets positifs qui deviennent parfois indésirables, résultent du rôle spécifique qu'exerce les Gc dans les divers tissus, dont les plus importants sont discutés ci-après.

Premièrement, les Gc activent la gluconéogenèse au niveau hépatique. Cette fonction primordiale du foie permet la production *de novo* de glucose à partir des acides aminés et des acides gras libres en période de stress ou de jeûne. L'utilisation de profilage d'expression, de CHIP-chip et de souris ayant une invalidation de GR dans le foie, a montré que les Gc/GR induisent directement la production de plusieurs gènes reliés au métabolisme énergétique (59;60). Parmi eux, GR contrôle l'expression de deux enzymes essentielles à la gluconéogenèse, soit la phosphoénolpyruvate-carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6Pase) (61). Les Gc provoquent également l'accumulation de gras dans le foie. Lors d'une exposition prolongée à des taux élevés de Gc (exogènes ou endogènes), il s'en suit la formation d'un "foie gras" (62), mais le mécanisme sous-jacent demeure nébuleux.

La redistribution des graisses dans le syndrome de Cushing vient de l'action dichotomique des Gc sur les cellules adipeuses. En effet, les Gc activent la lipolyse par des lipases hormono-sensibles et réduisent l'activité de la lipoprotéine lipase dans les dépôts de gras périphériques, ce qui provoque une perte de ces graisses. En contrepartie, ils favorisent la différenciation des adipocytes et l'activation des voies lipogéniques dans les tissus adipeux centraux et abdominaux. Ils activent également la thermogénèse dans les graisses brunes. Les patients Cushing présentent aussi une atrophie musculaire. Celle-ci est due aux effets métaboliques des Gc directement au niveau des muscles. Les muscles forment environ 40% de notre masse corporelle et en temps de besoins énergétiques aigus, ils

constituent une source majeure d'acides aminés qui serviront à la production d'énergie. En temps normal, les voies de réponse à l'insuline et à IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) permettent le maintien des masses musculaires et favorise leur utilisation du glucose. Lors d'infection, de stress ou de jeûne, l'augmentation des Gc circulants antagonise ces voies permettant l'utilisation prioritaire du glucose par le cerveau et le cœur, de même que la gluconéogenèse à partir des protéines musculaires dégradées. Par contre, à long terme les muscles s'atrophient (63). L'étude précise de l'action des Gc sur les adipocytes et les myocytes mérite d'être poursuivie et nécessitera certainement l'utilisation de souris dont GR aura été invalidé dans ces types cellulaires.

Après la sécrétion des Gc, leur bioactivité est régulée en contrôlant la concentration de la forme libre par la production de CBG, et plus localement en contrôlant l'expression du *multidrug resistance transporter* (MDR), de GR et des enzymes 11- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 $\beta$ -HSD). Il existe 2 types de 11 $\beta$ -HSD qui sont exprimées à différents niveaux dépendant des tissus. Le type 1 (11 $\beta$ -HSD1) catalyse la conversion de la forme inactive des Gc vers la forme active, soit de la cortisone ou la déhydrocorticostérone vers le cortisol ou la corticostérone respectivement. La réaction inverse est quant à elle opérée par le type 2 (11 $\beta$ -HSD2) (64). Ainsi le type 1 permet d'amplifier le signal des Gc dans certains tissus comme le foie, les adipocytes et le cerveau, alors que le type 2 en protège d'autres contre leurs effets délétères (65). Par exemple, le rein exprime de hauts niveaux de 11 $\beta$ -HSD2 pour éviter une action croisée entre les Gc circulants et le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR). Dans le néphron distal, ce cousin de GR ne doit répondre qu'à l'aldostérone malgré sa capacité de réagir aux Gc, pour contrôler de façon stricte la réabsorption du sodium. Des mutations de 11 $\beta$ -HSD2 engendrent une réactivité des néphrons aux Gc et provoque une rétention excessive de sodium, de l'hypokaliémie et de l'hypertension (66). L'invalidation de 11 $\beta$ -HSD1 chez des souris ne semble pas provoquer de désordres développementaux. Par contre, ces souris ne développent pas les symptômes d'obésité, d'hyperglycémie et de résistance à l'insuline en réponse aux stress et aux diètes riches en gras. Ainsi, beaucoup d'efforts sont investis afin d'identifier des inhibiteurs

spécifiques de  $11\beta$ -HSD1 pour tenter de traiter le syndrome métabolique et les symptômes d'une hyperactivité hépatique en réponse aux Gc (67;68).

Un des effets majeurs des Gc est évidemment la rétro-inhibition de l'axe HPA. Ils agissent à tous les niveaux, soit dans les neurones afférents à l'hypothalamus, dans l'hypothalamus directement et dans l'hypophyse. À ce niveau, ils inhibent la sécrétion de l'ACTH et la transcription du gène *Pomc*. En plus de l'effet répressif qu'ont les Gc sur la transcription de la POMC, ils répriment également l'expression du récepteur CRHR1. Cet autre niveau d'action permet de diminuer la sensibilité des cellules corticotropes à son signal afférent qu'est la CRH. La résultante globale est donc une diminution de la production/sécrétion de Gc par les glandes surrénales. Il est important que cette boucle de rétroaction fonctionne adéquatement pour éviter une sécrétion excessive de Gc qui engendre les effets secondaires discutés auparavant, mais également une hypersensibilité aux infections. En effet, grâce à leur action anti-inflammatoire, les Gc sont grandement utilisés pour traiter des affections auto-immunitaires et/ou inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, mais à plus long terme, il peut en découler une immunosuppression. Par ailleurs, de plus en plus d'évidences indiquent que les Gc ne jouent pas seulement ce rôle de frein, mais qu'ils permettent de diriger la réponse immunitaire (69). Par exemple, les Gc modulent le passage des cellules immunitaires au niveau du site d'inflammation et affectent la réponse immunitaire acquise en favorisant la transition entre la réponse dite cellulaire (Th1) vers la réponse humorale (Th2) (70).

Ce rôle de modulation plutôt que de suppression ne se fait pas seulement au niveau de la réponse immunitaire en affectant la destinée des cellules T *helper*, mais comme il a été mentionné dans la section précédente, les Gc agissent de concert avec les cytokines pro-inflammatoires pour induire l'*acute phase response*. Il semble que la modulation de l'action des Gc par certaines cytokines soit un mécanisme plus général. Le chapitre 3 démontre effectivement une synergie d'action entre les cytokines LIF/IL6 et les Gc dans l'activation d'une réponse généralisée de défense cellulaire innée.

### **1.3. Mécanismes de régulation transcriptionnelle des voies de stress**

Les stress de toutes natures affectent divers aspects de notre métabolisme. Ils provoquent l'envoi d'influx nerveux pour influencer rapidement les tissus cibles et induisent la libération de signaux (hormones, cytokines et Gc) dans la circulation sanguine et dans l'environnement immédiat des tissus (sécrétion paracrine). Ces signaux affectent directement certains processus comme la sécrétion, en plus d'influencer la régulation de l'expression des gènes.

#### **1.3.1. Les facteurs de transcription et l'ADN**

Chaque type cellulaire de notre organisme exprime un catalogue différent d'ARN, ce qui lui confère son identité et sa fonction. Ce catalogue n'est évidemment pas statique, il varie en fonction de l'environnement cellulaire pour lui permettre de s'y adapter et de jouer son rôle dans l'homéostasie de l'organisme entier. L'altération de l'expression génique en réponse aux signaux auxquels la cellule est exposée ou à des demandes développementales se fait par l'entremise des facteurs de transcription. Selon certaines estimations, les facteurs de transcription représenteraient environ 10% des gènes codant pour des protéines et à cause de leurs effets sur la régulation du transcriptome, leur expression est contrôlée de façon stricte. Le mécanisme primaire d'action des facteurs de transcription consiste à reconnaître et lier une séquence d'ADN qui leur est spécifique. Les éléments de réponse de divers facteurs de transcription sont très souvent regroupés, soit au promoteur des gènes (courte séquence en amont des gènes) ou dans des enhancers (séquence de régulation plus distante qui se retrouve en amont, en aval ou à l'intérieur des gènes, surtout dans les introns). La combinaison de ces éléments modulaires de réponse permet un contrôle histospécifique et temporel de l'expression de leur gène cible (71). Nous pourrions penser que ces modules sont soumis à des pressions évolutives énormes qui les conserveraient intégralement. Mais contrairement à cela, des études récentes nous montrent qu'il n'en est rien. En fait, les voies de signalisation/FT importants pour la régulation d'un gène particulier sont conservés entre les espèces, mais l'organisation et la localisation des



modules varient grandement (72;73). Bien que les facteurs de transcription soit les initiateurs du contrôle transcriptionnel, ils n'en sont pas les effecteurs. Suite à la liaison d'un facteur de transcription sur son élément de réponse, il induit le recrutement de complexes coactivateurs ou corépresseurs, de même que des complexes de remodelage de la chromatine. Le recrutement combinatoire de toutes ces protéines sur un locus donné contrôle le recrutement et l'activité de la machinerie transcriptionnelle et donc le niveau d'expression de ce gène (74).

Prenons l'exemple de la réponse transcriptionnelle initiée par les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL1. Ceux-ci sont sécrétés très rapidement après l'activation des macrophages et sont essentiels à l'activation de la réponse immunitaire. Lorsqu'ils lient leurs récepteurs à la membrane plasmique, TNF $\alpha$  et IL1 provoquent la phosphorylation rapide de la protéine inhibitrice I $\kappa$ B qui est ensuite dégradée par le protéasome. Ceci permet de libérer NF- $\kappa$ B de la rétention cytoplasmique imposée par I $\kappa$ B. Par la suite, l'hétérodimère p50/p65 qui compose normalement NF- $\kappa$ B est transloqué vers le noyau où il lie des éléments de réponse de type  $\kappa$ B. Pour activer la transcription de ses gènes cibles, il recrute des coactivateurs (CBP/p300, Swi/Snf, GCN5, PARP-1) et interagit avec le complexe médiateur et TBP (75). NF- $\kappa$ B est également activé plus précocement dans la réponse immunitaire innée suite à l'activation des *Toll-like receptor* (TLR) par la reconnaissance de molécules spécifiques aux micro-organismes. Il a donc un rôle fondamental dans l'activation des défenses immunitaires aigües (76).

La liaison d'IL6 avec son récepteur n'active pas seulement la voie de signalisation Jak-Stat3 (abordé dans la section 1.3.2). Elle peut aussi activer la voie PI3K/Akt qui, comme pour une stimulation TNF $\alpha$ , provoque la dégradation de I $\kappa$ B et ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B. Les Jak activent également la voie Ras-GTPases/MAPK qui permet l'activation d'un autre facteur bien connu pour son implication dans les voies de stress, C/EBP $\beta$  (77;78). Par ailleurs, l'inactivation de ce gène chez la souris cause des troubles multiples,

entre autres des défauts de développement et de différenciation de divers types cellulaires (hépatocytes, adipocytes, neurones, monocytes, etc.), de l'infertilité, une réponse immunitaire innée déficiente et autres. (79). La stimulation IL6 induit rapidement la transcription de C/EBP $\beta$  qui à son tour contrôle l'expression de plusieurs cytokines, dont IL6 et TNF $\alpha$ . Il active la transcription en liant l'ADN en homodimère ou hétérodimère avec d'autres membres de sa famille sur des boîtes CCAAT. Comme le font plusieurs FT, C/EBP $\beta$  est capable d'interagir physiquement avec d'autres FT grâce à leur liaison directe à l'ADN sur des sites contigus ou bien par un mécanisme de recrutement protéine:protéine (*tethering*). Jusqu'à maintenant, des interactions ont été décrites avec Sp1, c-Myb, PU.1, GR, Stat3, Stat5, et NF- $\kappa$ B, ce qui permet majoritairement une activation coopérative ou synergique en fonction des gènes cibles (80-85).

Le *tethering*, soit le recrutement d'un facteur de transcription sans contact à l'ADN sur un autre facteur de transcription qui lui est lié à l'ADN, est un mécanisme de régulation transcriptionnel plus répandu qu'on peut le croire. La première description de ce phénomène fut la transrépression par GR sur AP-1 (86-88). Depuis ce temps, plusieurs FT se sont découvert des rôles de "cofacteurs", dont les Stat, NF- $\kappa$ B, C/EBP, CREB, IRF, Sp1 et bien d'autres. En plus de leur rôle transcriptionnel directement à l'ADN, la modulation de l'action d'autres FT ajoute une énorme complexité qui permet une régulation fine du transcriptome. Durant l'analyse des sites de liaison génomiques des FT, plusieurs investigateurs sont tentés d'ignorer les sites de recrutement qui ne contiennent pas de séquence de liaison canonique pour ces facteurs (souvent plus de 20% des sites). Cela pourrait être une erreur, puisque plusieurs d'entre eux s'avèrent être réellement des événements de recrutement par *tethering*, ainsi ces analyses ignorent les interrelations qui sont établies entre les différentes voies de signalisation. Le chapitre 4 montre à quel point ce mécanisme est important dans la régulation de Stat3 et GR.

### 1.3.2. Stat3

Les FT responsables de la transduction des signaux envoyés par les interférons/cytokines ne sont connus que depuis 1992 (89-91). Depuis, d'énormes efforts ont été accomplis et le mécanisme d'activation de ces voies de signalisation est maintenant bien connu. Ainsi, lorsqu'une cytokine lie son récepteur transmembranaire spécifique, il s'en suit une cascade de phosphorylation rapide permettant l'activation, la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN des membres de la famille des Stat (*signal transducers and activators of transcription*). Des dérèglements de cette voie sont associés à plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunitaires (92). Par surcroît, Stat3 est également activé de façon constitutive dans plusieurs cancers. Il est donc compréhensible que le niveau d'activation de Stat3 soit régulé par plusieurs mécanismes.

#### 1.3.2.1. La famille des Stat

Depuis le début du siècle, les FT de la famille Stat font l'objet d'une recherche intensive. En effet, ils sont le sujet d'environ 1000 publications annuellement, mais GR n'est pas en reste avec une moyenne de 500 (contre 30 pour NeuroD1, 20 pour Pitx1 et 5 pour Tpit). Toute cette attention est révélatrice d'une importance biologique indéniable, mais reflète également que les voies Stat et GR sont des cibles pharmaceutiques intéressantes pour contrôler des dérèglements métaboliques.

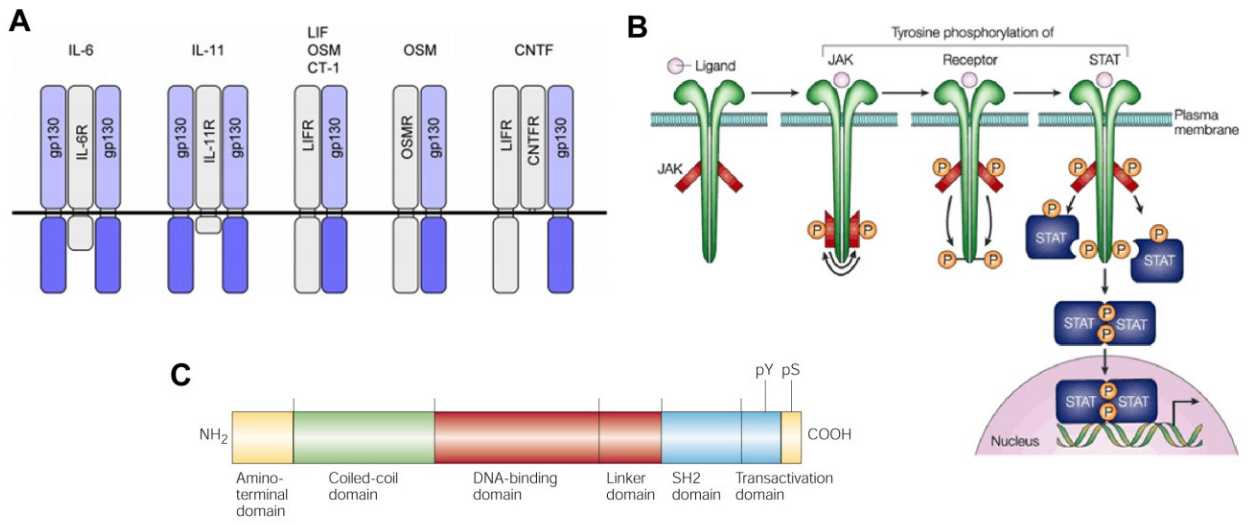
Cette famille de FT est constituée de 7 membres (Stat1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6) dont la taille varie entre 750 et 850 acides aminés (jusqu'à 925 aa chez la souris). Les gènes qui encodent ces FT sont regroupés sur trois chromosomes chez les mammifères. Chez la souris, les gènes de Stat1 et Stat4 sont sur le chr1, Stat2 et 6 sur le chr2, et Stat3, Stat5a et Stat5b sont sur le chromosome 11 (93). Cette organisation suggère une origine ancestrale commune à tous les membres de cette famille qui provient probablement d'une duplication du gène ancestral suivi par une réplication du locus sur d'autres chromosomes. La

découverte de gènes Stat chez la drosophile, *C. elegans* et d'autres est venue appuyer cette hypothèse (94;95). Malgré, leur grande homologie structurale, le rôle qui est assigné à chacun de ces membres est plutôt spécifique. Par exemple, la réponse aux IFN $\gamma$  est médiée uniquement par Stat1, tandis que l'IFN $\alpha$  active plutôt ISGF3 (un complexe transcriptionnel trimérique constitué de Stat1, Stat2 et IRF9). Les souris KO confirment également des rôles spécifiques des différents Stat. Alors que le mutant de Stat3 est létal au niveau embryonnaire, la souris Stat1 est hypersensible aux infections et au développement de tumeurs à cause d'une activité IFN $\gamma$  déficiente. Les souris KO Stat2 sont sensibles aux infections virales, puisque la réponse aux IFN $\alpha/\beta$  est incomplète. Les mutants Stat4 et 6 ont une réponse Th1 et Th2 respectivement atténuée. Même avec leur très grande homologie de séquence, les KO Stat5a/b montrent des phénotypes distincts. La souris Stat5a n'a pas de développement des glandes mammaires en réponse à la prolactine, alors que les souris Stat5b ont un retard de croissance à cause d'une réponse imparfaite à GH (revu dans (96)). Nonobstant cette signalisation compartimentée induite par les récepteurs des cytokines, des voies de signalisation alternatives peuvent également être activées par les récepteurs. Par exemple, la kinase Jak peut activer la PI3K qui à son tour peut influencer la voie NF- $\kappa$ B. La grande famille des récepteurs aux cytokines incluent également les récepteurs transmembranaires homodimériques de certains facteurs de croissance et des hormones hypophysaires GH et prolactine. Ces dernières activent respectivement Stat5b et Stat5a via Jak2 (97). Puisque les combinaisons signal-récepteur-kinase-Stat sont multiples et que chacune a ses particularités, la suite de la présente section se concentrera principalement sur les cytokines pro-inflammatoires de la famille IL6.

### **1.3.2.2. Activation de la voie de signalisation de type gp130**

Les cytokines de la famille IL6 dont font partie IL6, LIF, IL11, CT-1, CNTF et OSM, sont également connues sous le nom cytokines gp130. La raison est simple, elles signalent toutes via un complexe de récepteurs transmembranaires contenant au moins une sous-unité du récepteur gp130. Il est constitué d'un domaine extracellulaire de 597 aa, d'un

petit domaine transmembranaire de 22 aa et du domaine intracellulaire de 277 aa. Lorsque la cytokine se lie à la sous-unité alpha qui est spécifique à chaque cytokine de la famille, il en résulte la formation d'un complexe avec la sous-unité beta: gp130 (Figure 1.8A). Cette oligomérisation provoque l'activation des tyrosines kinases de la famille Jak qui s'autophosphorylent. Parmi les 4 membres de la famille, Jak1, Jak2 et Tyk2 ont été associés à la signalisation gp130. Conséquemment, Jak catalyse l'ajout de groupements phosphate sur la portion intracellulaire des récepteurs ce qui crée des sites de reconnaissance pour les protéines ayant un domaine SH2, dont les Stat font partie (Figure 1.8B, C). L'association des domaines SH2 de Stat1 et/ou Stat3 avec les tyrosines phosphorylées des récepteurs engendre une proximité avec Jak. En conséquence, Jak phosphoryle Stat1 sur la tyrosine 701 et Stat3 sur Tyr705 permettant alors leur hétéro- ou homodimérisation par une reconnaissance mutuelle entre le domaine SH2 et la tyrosine nouvellement phosphorylée (Figure 1.8B et C). Le dimère se retrouve ensuite au noyau, en grande partie dans des corps nucléaires associés à des régions transcriptionnellement actives, où il joue son rôle de facteur de transcription (98;99).



**Figure 1.8.: Architecture et cascade d'activation de la voie gp130-Jak-Stat.**

**A)** Différents complexes de récepteurs formés par l'oligomérisation de la sous-unité ubiquitaire gp130 et la sous-unité spécifique aux membres de la famille IL6. Tiré de (100)

**B)** Cascade d'activation de la voie Jak-Stat. Tiré de (101)

**C)** Structure générale des facteurs de transcription Stat. Adapté de (101)

### 1.3.2.3. Structure et modifications de Stat3

Les membres de la famille Stat partagent une forte homologie structurale avec Stat3. Comme la plupart des FT, ils sont des protéines regroupant différents modules de fonction spécifique. Le domaine amino-terminal (Figure 1.8C) serait impliqué dans l'import/export nucléaire, de même que dans la stabilisation de l'interaction entre deux dimères de Stat lorsque lié à un site contenant un tandem de SBE de faible affinité (102). Par contre, cette liaison tétramérique semble être un évènement marginal et n'a pas été décrite pour Stat3. Le domaine coiled-coil est constitué d'un paquet de quatre hélices  $\alpha$  qui est physiquement en retrait de la structure principale de Stat3. Il est impliqué dans des contacts avec des cofacteurs et d'autres facteurs de transcription comme CBP/p300, c-Jun, NF- $\kappa$ B et GR. Par contre, les résidus directement ciblés dans ces interactions ne sont pas décrits. De plus, plusieurs interactions passent également par le domaine carboxy-terminal. Il a également été montré que le domaine coiled-coil permet une association constitutive de

Stat3 avec le récepteur IL22 qui est indépendante des phosphorylations de sa queue cytoplasmique. Ce mode de recrutement différent des autres récepteurs est nécessaire à l'activation adéquate de la réponse à IL22 (103).

Quant au C-terminal, il contient un domaine de transactivation (TAD) qui est très variable entre les membres de la famille. Ceci apporte probablement une spécificité dans l'effet transcriptionnel des différents Stat puisque leurs domaines de liaison à l'ADN (DBD) qui est constitué de repliements de feuillet  $\beta$  de type immunoglobuline, reconnaissent tous une séquence de type SBE (ou GAS, TTCnnnGAA). Chez Stat1, 3, 4 et 5, le TAD contient un résidu sérine ( $S^{727}$  chez Stat1 et Stat3) qui augmente le potentiel de transactivation lorsqu'il est phosphorylé (104;105). Une mutation de cette sérine diminue l'activité transcriptionnelle et la régulation des gènes cibles, car la charge négative introduite par la phosphorylation semble importante pour l'interaction avec le coactivateur p300 (106) et affecte possiblement la structure tertiaire des Stat. Malgré que la fonction exacte de cette modification post-traductionnelle soit toujours débattue, elle semble être un mécanisme utilisé par Stat3 pour intégrer différentes voies de signalisation. En effet, en plus du signal IL6, plusieurs voies ont été démontrées capables d'induire la phosphorylation de la Ser727 via différentes kinases reconnaissant le motif PxSP, comme par exemple les voies EGF, NGF,  $IFN\gamma$ , Notch, etc. (107-109).

Près du TAD, le domaine C-terminal contient une tyrosine localisée à une position avoisinant 700, qui est la cible de phosphorylation par les membres de la famille Jak et qui permet l'activation des Stat. Le domaine C-terminal est adjacent au domaine SH2 qui, comme décrit ci-haut, est important pour l'association des Stat3 avec les récepteurs de cytokines phosphorylés sur leur queue cytoplasmique, mais également à l'homo- ou l'hétérodimérisation des Stat suite à leur phosphorylation sur la  $Y^{700}$ . La formation de ce dimère de Stat forme une structure tridimensionnelle qui ressemble à une pince leur permettant de lier l'ADN (110;111). Un domaine *linker* situé entre le DBD et le SH2 donne

de la flexibilité au dimère et lui permet d'adopter la bonne conformation pour lier l'ADN (Figure 1.8C).

En plus d'induire la phosphorylation des Ser727 et Tyr705, l'activation du récepteur gp130 provoque l'ajout d'un groupement acétyl sur la lysine 685. L'acétylation de K<sup>685</sup> se fait via une interaction directe de Stat3 avec l'histone acétyl-transférase p300 et que cette modification est réversible par un contact avec les histones déacétylases de type HDAC. La mutation de cette lysine démontre que l'acétylation stabilise grandement la formation du dimère et la liaison à l'ADN en plus d'être essentielle à l'activité transcriptionnelle de Stat3 (112). La découverte d'autres modifications post-traductionnelles est sûrement à l'ordre du jour. Par exemple, il a été démontré que la Thr92 de Stat5 est une cible d'O-glycosylation en réponse aux cytokines. La mutation de cette Thr diminue grandement l'interaction de Stat5 avec CBP en plus d'empêcher l'activation de ses gènes cibles. Cette thréonine est conservée et glycosylée chez Stat1, Stat3 et Stat6, alors il s'agit peut-être d'un mécanisme important pour la régulation de cette famille (113).

#### 1.3.2.4. Isoformes de Stat3

Dans la cellule, Stat3 est produit sous deux formes grâce à un épissage alternatif de son ARN pré-messager. Stat3 $\alpha$  est l'isoforme le plus connu et le mieux étudié, il est constitué de 770 aa. L'épissage utilise un site accepteur alternatif dans l'exon 23 pour produire une forme plus courte, Stat3 $\beta$ , contenant les mêmes 715 premiers aa suivis de 7 nouveaux. Cette forme a longtemps été considérée comme un dominant négatif puisque Stat3 $\beta$  n'a pas le domaine de transactivation (114). Il est vrai que son activité transcriptionnelle est fortement réduite en comparaison à la forme longue et qu'il peut compétitionner avec Stat3 $\alpha$ . La délétion spécifique de Stat3 $\beta$  par l'abolition du site d'épissage alternatif, provoque une *acute phase response* exacerbée en réponse à des endotoxines et provoque un décès par choc septique (115). Dans ce cas, la fonction antagoniste de l'isoforme  $\beta$  sur Stat3 $\alpha$  est décisive. Par contre, des études récentes montrent



qu'il aurait une fonction spécifique. L'introduction de son expression chez la souris Stat3 KO compense le phénotype de mort embryonnaire. Donc son activité transcriptionnelle atténuée est suffisante pour activer certains gènes essentiels durant le développement (116). En somme, les effets transcriptionnels de Stat3 semblent dépendre du dosage de ses isoformes et de leurs activités intrinsèques.

### 1.3.2.5. La régulation transcriptionnelle

En plus de répondre à la voie gp130 de la famille IL6, il a été démontré que Stat3 peut être activé par plusieurs autres sources signalétiques: la famille IL10 (IL10, IL19, IL20, IL22, IL24 et IL26), G-CSF, leptine, IL21, IL27, de même que plusieurs facteurs de croissance (117). Stat3 est impliqué dans une foule de processus cellulaires importants tel que: contrôle de la prolifération, survie, croissance, migration, différenciation, mécanisme inflammatoire et de défense, etc. (118). La phosphorylation de Stat3 sur sa Tyr705 induit sa dimérisation, sa translocation nucléaire et lui permet de lier l'ADN. Le mode d'action transcriptionnel primaire de Stat3 implique sa liaison en dimère sur une séquence régulatrice nommée SBE (*Stat binding element*) ou historiquement GAS (*IFN $\gamma$  activated sequence*), dont le consensus stricte est TTCCGGGAA.

Une fois à l'ADN, Stat3 recrute des coactivateurs, principalement par son domaine de transactivation. Les mieux décrits sont les histones acétyl-transférases (HAT) CBP/p300. Grâce à cette interaction, les HAT ajoutent des groupements acétyl sur les protéines qui les entourent ainsi que sur les queues d'histones pour favoriser l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription (97;119). L'activité HAT de CBP/p300 est essentielle à l'activation transcriptionnelle, mais sur Stat3 elle semble dépendre du co-recrutement de NCoA/SRC1 (120). Ce dernier est recruté par l'entremise d'une courte région (751-762 aa) du TAD de Stat3 (121). Le *N-myc interactor* (Nmi, maintenant mieux connu sous le nom *N-myc and Stat interactor*) est lui aussi recruté par le domaine N-terminal des facteurs Stat, à l'exception de Stat2 qui recrute également des coactivateurs

différents, comme les HAT PCAF et Gcn5 (98). Nmi ne contient pas de domaine de transactivation intrinsèque, son recrutement permet plutôt d'accroître la mobilisation de CBP/p300 (122). Alors, le complexe de transactivation qui se retrouve rapidement sur les SBE suite à l'activation des voies gp130 est constitué de Stat3, CBP/p300, et de SRC1 et Nmi pour lesquels on ne sait pas si l'association avec Stat3 est mutuellement exclusive et si elle est généralisée à tous les SBE recrutant Stat3.

Comme il en a été question à la section 1.3.1, l'action des FT sur les gènes cibles ne se fait pas en vase clos. L'agencement des TFBS sur un module de régulation (enhancer, promoteur ou LCR) lui permet de fournir une réponse spécifique découlant de l'intégration de plusieurs voies de signalisation. Ces modules constituent donc le point final où les différentes voies s'influencent: principalement par la coopération ou la rivalité entre les FT et les cofacteurs qu'ils amènent. Évidemment, Stat3 n'est pas exclu de ce concept. Il a été démontré que Stat3 engendre une activation synergique lorsqu'il est lié à proximité d'autres FT dont AP-1 (123), HIF-1 $\alpha$  (un FT apparenté à CREB) (124), SP1 (125), AR (126), GR (127) et Smad1 (128). Dans la majorité des cas, le co-recrutement de Stat3 avec ces facteurs stabilise leur liaison et augmente le recrutement de p300. Dans certains cas, cet effet n'est pas médié par un contact protéine:protéine entre les FT, mais plutôt grâce à un pont créé par p300 (128). Stat3 influence également les autres FT en s'y liant par *tethering*. Contrairement à GR qui a majoritairement un effet de transrépression, Stat3 provoque une activation minimalement additive mais qui est, dans la majorité des cas, synergique. Jusqu'à maintenant, il a été démontré que Stat3 peut se lier par *tethering* à SP1 sur le promoteur de VEGF (129), à CREB sur le promoteur de C/EBP $\beta$  (80) et à GR sur des éléments GRE d'un rapporteur MMTV (130). Le chapitre 4 de cette thèse démontre que le *tethering* de Stat3 sur GR est un mécanisme très utilisé pour transmettre la synergie entre les voies LIF et Gc. Cette liste d'interactions fonctionnelles entre Stat3 et d'autres FT est probablement beaucoup plus longue si on tient compte des nombreuses études ayant démontrées l'influence des cytokines gp130 sur de multiples signaux (131).

La liaison des cytokines à leur récepteur ne fait pas qu'activer un catalogue de gènes, elle permet également la répression. Par contre, il n'a pas été démontré clairement que Stat3 soit capable de réprimer l'expression des gènes en liant directement l'ADN, il semble être uniquement activateur. Un exemple de gène réputé être réprimé par la liaison de Stat3 sur son promoteur est eNOS. Dans des cellules endothéliales de l'aorte, IL6 induit le recrutement de Stat3 au promoteur de eNOS qui est ensuite réprimé (132). Le mécanisme exact de cette répression n'a pas été démontré, alors il pourrait s'agir par exemple d'une liaison concomitante avec un FT répresseur ou d'une compétition avec un autre facteur pour l'accès à des sites de liaison se chevauchant. GR utilise cette technique pour réprimer le promoteur d'*Osteocalcine* grâce à un GRE qui chevauche la boîte TATA (133). Stat3 agirait plutôt par l'intermédiaire de médiateurs secondaires. Par exemple, il a été démontré qu'en réponse à IL10, Stat3 induit la transcription du FT NFIL3 qui à son tour inhibe le gène *IL12b* en étant recruté sur un enhancer situé à -10 Kb (134). Plus d'études seront nécessaires pour identifier les médiateurs secondaires responsables de l'effet répresseur d'une stimulation par les cytokines gp130.

#### **1.3.2.6. L'inactivation de la voie Jak-Stat**

Une des principales caractéristiques de la voie gp130-Jak-Stat3 est son activation rapide, cependant celle-ci est transitoire. La cellule possède plusieurs mécanismes permettant de désactiver cette voie. Premièrement, les phosphatases TC45, SHP-2 et TC-PTP ont été impliqués dans la déphosphorylation des Stat, ce qui est une étape essentielle pour l'export nucléaire de ceux-ci (135). Par ailleurs, SHP-1, SHP-2 et PTP1B déphosphorylent également les récepteurs des cytokines et les Jak, empêchant donc la transduction du signal (117). Quant à elle, la petite phosphatase LMW-DSP2 interagit avec Stat3 au niveau cytoplasmique pour le déphosphoryler et ainsi bloquer sa translocation nucléaire (136). La *protein tyrosine phosphatase receptor T* (PTPRT) intervient au même niveau. Des mutations de PTPRT sont souvent retrouvées dans les cancers colorectaux qui découleraient ainsi d'une suractivation de Stat3 (137).

À la suite d'une stimulation IL6, la transcription du gène *Pias3* est activée. Ce gène encode une protéine de la famille *protein inhibitor of activated Stat*. Pias3 se lie à Stat3 dans le noyau et empêche sa liaison à l'ADN, donc inhibe son activité transcriptionnelle (138). Bien que Pias3 soit une E3-SUMO-ligase, il n'est toujours pas clair si cette activité est nécessaire à son action inhibitrice sur Stat3. Pias3 et les autres membres de la famille interfèrent également avec l'activité transcriptionnelle d'autres FT, comme entre autre le récepteur aux androgènes (139), NF- $\kappa$ B (140) et MR, mais pas directement GR (141). En fonction du contexte, il peut aussi jouer un rôle d'activateur, ainsi il potentialise l'action de Smad3 en réponse à TGF $\beta$  (142).

Une des cibles transcriptionnelles privilégiées de Stat3 est le membre de la famille des *suppressor of cytokine signaling*, Socs3. Le locus *Socs3* est jonché de sites de liaison de Stat3 qui activent très rapidement sa transcription. Par la suite, Socs3 joue un rôle de rétro-inhibition de la voie en liant les récepteurs aux cytokines et les Jak via son domaine SH2 central (143). Ces interactions empêchent l'association de Stat3 avec le récepteur et abroge l'activité catalytique de Jak. D'autres mécanismes d'inhibition de la voie Jak-Stat ont été rapporté, mais leur mode d'action est toujours nébuleux (144).

### 1.3.3. GR

Les actions biologiques des Gc sont majoritairement médiées par le récepteur des Gc (GR, NR3C1). Il est membre de la sous-famille des récepteurs stéroïdiens (NR3) des récepteurs nucléaires, dont font également partie les récepteurs aux estrogènes (ER $\alpha$ , NR3A1 et ER $\beta$ , NR3A2), le récepteur des minéralocorticoïdes (MR, NR3C2), le récepteur de progestérone (PR, NR3C3) et le récepteur des androgènes (AR, NR3C4) (145). GR est exprimé de façon ubiquitaire à travers la majorité des tissus de l'organisme, ce qui permet aux Gc d'affecter l'homéostasie générale de façon précise et sensible (146). Néanmoins,

cette régulation sensible ne signifie pas que les Gc contrôlent de façon restreinte un petit nombre de gènes, puisque plusieurs études de transcriptomique indiquent qu'en fonction du type cellulaire, ils peuvent affecter jusqu'à 20% des gènes. Uniquement en 2008, plus de 44 millions d'ordonnances de Gc ont été prescrites aux États-Unis (147). Par conséquent, il me paraît essentiel que les recherches futures explorent tous les modes d'action de GR, car en ce moment les glucocorticoïdes sont prescrits à un rythme effréné pour leurs effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs, mais nous ne comprenons que très marginalement la diversité de leurs actions. Les mécanismes d'action et de contrôle de l'effet des Gc/GR seront discutés dans cette section.

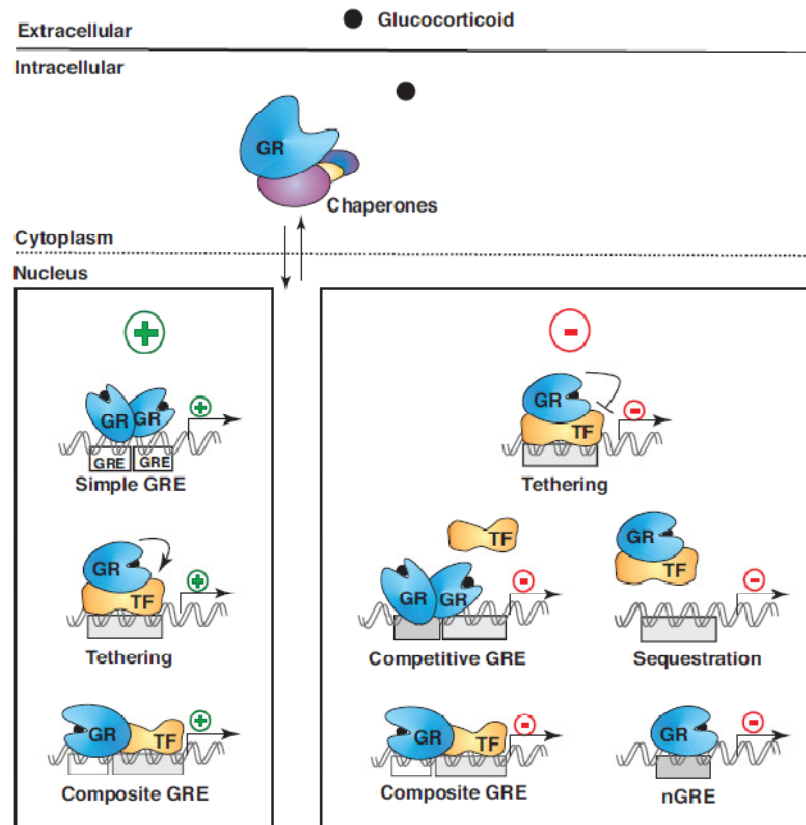
#### **1.3.3.1. Activation du récepteur**

En absence de Gc, GR est maintenu dans le cytoplasme en association avec un complexe multi-protéique de chaperonnes, composé de hsp90 et hsp70, immunophiline 59 et phosphoprotéine p23 (148). Lorsque les Gc sont relâchés dans la circulation sanguine, ils se retrouvent rapidement dans le cytoplasme des cellules puisque leur caractère liposoluble leur permet de traverser la membrane plasmique. La liaison d'une molécule de Gc dans le domaine de liaison du ligand de GR (LBD) induit un changement de conformation qui lui permet de se dissocier du complexe chaperon et de démasquer son signal de localisation nucléaire (NLS). Ceci induit sa translocation vers le noyau, où il agit par différents modes d'action.

#### **1.3.3.2. L'activation transcriptionnelle**

La fonction la mieux connue de GR est l'activation transcriptionnelle qui suit sa liaison en homodimère à l'ADN. Suite à sa translocation vers le noyau, le GR activé homodimérise et lie le sillon majeur de l'ADN via son DBD à doigts de zinc. Ce dimère reconnaît une séquence palindromique d'ADN qui est spécifique aux récepteurs stéroïdiens de type NR3C. Cet élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) est représenté par le

motif suivant: AGAACAnnnTGTTCT, dans lequel toutes les bases n'ont pas la même importance. Ainsi, la structure cristallographique du DBD a confirmé que GR interagit principalement avec les bases 2, 4, 5, et 6 du premier demi-site, et inversement pour le second demi-site (149;150). Contrairement à ce qu'il a longtemps été rapporté, l'identité des trois bases centrales (n) du GRE peuvent avoir une certaine influence sur le niveau de réponse de ce site de liaison (150). Dans son intégralité, la séquence du GRE a une importance pour la transduction du signal de GR, car elle induit un changement de conformation au niveau du DBD qui est propagé à l'AF1 (domaine de transactivation situé dans le N-terminal) et possiblement aux autres domaines, ce qui modifie la capacité d'interaction avec les corégulateurs (150;151). Des études de mutagenèse ont également montré que GR utilise tantôt l'AF1, tantôt l'AF2 (situé dans le C-terminal) ou les deux pour induire la transcription de ses gènes cibles (152). Ainsi, les effecteurs et médiateurs de la transcription que GR amène à l'ADN doivent varier en fonction du contexte chromosomique local. Parmi ceux-ci, GR interagit avec les coactivateurs de la famille p160 (SRC1, SRC2 et SRC3), les histone acétyl transférases (p300/CBP), des membres du complexe de remodelage de la chromatine Swi/Snf (153), TIF1 $\beta$  (154) et bien d'autres (155). Plus récemment, TTC5 (*tetratricopeptide repeat domain 5*) a été identifié comme cofacteur de GR. En plus d'être recruté à l'ADN avec GR, TTC5 stabilise et augmente sa demi-vie en l'empêchant d'être dégradé par le protéasome (156). La liste des corégulateurs de GR s'allonge d'années en années, nous indiquant l'incroyable complexité de sa régulation transcriptionnelle.



**Figure 1.9.: Représentation schématique des différents modes de régulation transcriptionnelle de GR.**  
(Tiré de (157))

### 1.3.3.3. La répression transcriptionnelle

Bien qu'il a été démontré que GR peut induire une répression transcriptionnelle en liant des séquences apparentées mais différentes des GRE (158;159), il semble que ces nGRE (*negative GRE*) ne soient pas le mécanisme principal de répression par les Gc (Figure 1.8). Ces sites de liaison rarissimes n'arborent pas de séquence consensus précise et des expériences de CHIP-chip et CHIP-seq ne parviennent pas à identifier ces sites de liaison. Les sites retrouvés sont plutôt des GRE activateurs classiques ((59;160;161) et le chapitre 4 du présent ouvrage). Une récente étude de grande envergure rapporte avoir identifié un nouveau type de nGRE permettant la répression par GR via une liaison directe

de celui-ci à l'ADN (162). Ce IR nGRE est conservé entre les espèces et plus de 1000 sites ont été identifiés par recherche *in silico*. Malgré toutes les expériences et les associations indirectes présentées dans cette publication, les conclusions sont discutables. La principale raison réside dans la séquence du IR nGRE (CTCCGGAGA) qui est très apparentée à un élément de liaison de la famille des Stat (TTCCGGGAA). De plus, les expériences ont été faites en présence d'une cytokine pro-inflammatoire (IL1 $\beta$ ) qui permet l'activation de facteurs de transcription de type Stat. Il est donc fortement plausible que GR soit recruté à ces cibles par un mécanisme de recrutement protéine:protéine. Le chapitre 4 de cette thèse apporte des évidences que les fonctions principales de GR au niveau de l'ADN sont l'activation par liaison directe à des GRE et la transrépression par recrutement protéine:protéine.

#### **1.3.3.4. Transrépression versus synergie**

Le premier évènement de recrutement par *tethering* d'un FT à un autre fut élucidé en 1990 lorsque trois groupes ont démontré que GR est recruté sans contact avec l'ADN sur AP-1 et que cette interaction cause l'abolition de l'effet activateur de AP-1 (86;88;163). En 1988, un groupe avait suggéré ce mécanisme d'action de GR sur CREB, sans toutefois le démontrer (164), ce qu'ils ont fait trois années plus tard (165). Ce mécanisme fut appelé transrépression. Depuis, il a été démontré que plusieurs FT peuvent agir par un mode de *tethering* (qui pourrait se traduire littéralement par "attachement"), bien qu'il soit souvent activateur, tel que décrit pour Stat3 dans la section précédente. Par ailleurs, GR utilise le *tethering* sur divers FT pour exercer son effet anti-inflammatoire. De façon importante, il transréprime l'action de NF- $\kappa$ B et de AP-1 sur des gènes cibles pro-inflammatoires (Figure 1.9) (166). Réciproquement, ces deux facteurs inhibent l'action de GR lié à l'ADN suite à leur recrutement par *tethering* (87;167).

Sur ces cibles de recrutement protéine:protéine GR est, selon toute vraisemblance, recruté sous sa forme monomérique (168). L'utilisation de mutants empêchant sa



dimérisation démontre bien qu'il perd sa capacité de lier des GRE, mais conserve ses fonctions associées au *tethering* (157;168). Cette fonction de GR semble essentielle puisque contrairement à des souris GR<sup>-/-</sup>, des souris exprimant un mutant de dimérisation de GR (GR<sup>dim/dim</sup>), donc ne pouvant lier l'ADN, ne meurent pas après la naissance (169). De plus, ces souris réussissent tout de même à modérer la réponse immunitaire (170).

Même si le mécanisme par lequel cette transrépression s'installe est mal compris et probablement varié, il ne semble pas que ce soit dû à une diminution du recrutement de coactivateurs (171;172). Par exemple, durant la réponse à une stimulation du récepteur TLR4, le *tethering* réciproque de NF-κB et IRF3 permet d'activer une série de gènes cibles; en présence de Gc, GR s'attache à la sous-unité p65 de NF-κB éliminant ainsi cette interaction et inhibant leur transactivation synergique (173). Des expériences de *yeast two-hybrid* ont permis d'identifier comme partenaire de GR une forme nucléaire d'une protéine de la famille zyxin à domaines LIM normalement impliquée dans les adhésions focales, nTrip6. Cette protéine semble agir comme échafaudage pour le recrutement de coactivateurs sur AP-1 (via Fos seulement) et NF-κB, mais est également impliquée dans le recrutement par *tethering* de GR. L'abolition spécifique par siRNA de nTrip6 empêche le recrutement de GR et son activité transrépressive (174;175). Par ailleurs, SRC2/GRIP-1 qui agit à titre de coactivateur de GR lorsqu'il est lié sur des GRE, change son fusil d'épaule et devient corépresseur quand GR est recruté par *tethering* sur AP-1 ou NF-κB (176). Il semble que SRC2 utilise des domaines différents de sa structure pour jouer son rôle d'activateur ou de répresseur. Les autres membres de la famille p160 (SRC1 et SRC3) sont incapables de transduire l'action répressive du *tethering* de GR, malgré qu'ils soient des coactivateurs de GR sur des GRE (176). La réduction de l'acétylation des histones est un autre mécanisme qui semble être utilisé par GR pour diminuer la capacité de ces loci cibles. En effet, GR recrute l'histone déacétylase 2 (HDAC2) lorsqu'il est lié par *tethering* à NF-κB sur le promoteur GM-CSF (177) et à Nur77 sur le promoteur POMC (153). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de méthylase de l'ADN semble indiquer que le recrutement de ces enzymes et la méthylation de l'ADN serait un mécanisme utilisé par GR durant la

transrépression (178). Les méthylases impliquées dans cette réponse n'ont pas encore été identifiées.

Cette propriété de GR a été beaucoup étudiée en fonction de la transrépression sur AP-1 et NF- $\kappa$ B. Par contre, on sait maintenant que beaucoup d'autres FT supportent le *tethering* de GR. Parmi eux, CREB (165), Oct-1 (179), PU.1 (180) et GATA-1 (181) font l'objet de transrépression. Outre ces effets répresseurs, le recrutement de GR par *tethering* sur certains facteurs pourrait induire une synergie. Cette suggestion a été faite pour C/EBP $\beta$ , mais la démonstration est incomplète (182). L'effet synergique du recrutement de GR sur Stat1, Stat3 et surtout Stat5 semble accepté par la communauté scientifique (130;183-186). Par contre, les expérimentations utilisées pour le démontrer demeurent circonstanciées. Par exemple, ils ont détecté une perte de la synergie entre Stat5 et GR suite à la mutation du site Stat du promoteur  $\beta$ -caséine qui ne contient pas de GRE consensus, mais qui contient 7 demi-GRE. Donc il est possible que GR soit recruté à des demi-sites ou des sites de faible affinité via une stabilisation par un site Stat contigu. Même le maintien de l'expression des gènes Stat5-dépendant chez la souris GR<sup>dim/dim</sup> n'exclut pas complètement cette hypothèse (187), puisque GR pourrait toujours être recruté en monomère sur un site composite. Lorsque GR se lie à proximité d'autres FT sur des sites adjacents (composites) ou relativement plus éloignés, il induit une liaison et une activation transcriptionnelle synergique avec ceux-ci (Figure 1.9). De multiples exemples de FT ayant une interaction fonctionnelle synergique avec GR ont été publiés, par exemple: Pbx-1 (188), Ets2 (189), HNF3 (190), AP-1 (191;192), NF- $\kappa$ B (193), C/EBP $\beta$  (160), CREB (194), NF-1 et Stat5 (195). Le chapitre 3 de cet ouvrage illustre une importante synergie entre les voies LIF/IL6 et Gc, alors que le chapitre 4 démontre que le recrutement de Stat3 et de GR directement à l'ADN sur des sites proximaux engendre une synergie de liaison et transcriptionnelle.

Malgré tous les efforts mis dans la compréhension du *tethering* par GR, nous sommes toujours bien loin de comprendre pourquoi un site AP-1, NF- $\kappa$ B ou Stat3 recrute

GR, alors que d'autres ne le font pas. Est-ce une question de séquence du site recrutant ces facteurs? Est-ce à cause de la signature chromatinienne (modifications post-traductionnelles des queues d'histones, méthylation de l'ADN, état de compaction de la chromatine) avoisinant ces sites? Ou bien est-ce dû à la combinaison des autres FT liant cette région régulatrice? Toutes les questions sont ouvertes, mais peu d'évidences nous permettent de proposer une réponse.

### 1.3.3.5. Les actions non-génomiques

Il existe de plus en plus d'évidences d'actions non-génomiques de GR activé par Gc. Des effets non-génomiques, donc distincts de l'action transcriptionnelle de GR, ont été répertoriés sur diverses voies, dont l'action anti-inflammatoire des Gc (196) mais également des effets indésirables comme la résistance à l'insuline (197). Ces effets sont dits "non-génomiques", mais en fait le mécanisme par lequel ils interfèrent avec ces voies de signalisation est plutôt mal compris. Ils semblent médiés par une diminution de la phosphorylation de certains effecteurs de ces voies. Dans un cas précis, il a été démontré que GR induit la transcription de la phosphatase MKP1 qui ensuite retire la phosphorylation d'AP-1, empêchant donc son activité transcriptionnelle (196). De plus, GR induit la transcription de l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, ce qui diminue la durée d'activation des voies inflammatoires impliquant ce facteur (198). S'il s'avère que toutes les actions "non-génomiques" de GR ayant trait à une diminution de phosphorylations activatrices de voies de signalisation sont la conséquence d'une production *de novo* de phosphatases via une liaison à l'ADN de GR sur leur locus respectif, on ne peut selon moi pas affirmer que ce sont des effets "non-génomiques".

Les actions répressives de GR ne sont pas uniquement reliées à la liaison de nGRE et au *tethering* d'autres FT. GR peut également contrôler la demi-vie des ARNm. En effet, en réponse aux Gc, GR peut lier directement un motif GC-riche ayant une certaine structure secondaire pour ensuite réduire substantiellement la demi-vie du messenger ciblé. Par

exemple, la demi-vie des ARNm CCL2 et CCL7 est diminuée d'environ 90% suite à l'activation de GR par son ligand. Plus de 450 ARNm interagissent avec GR dans des cellules épithéliales de trachée et il a été conclu par analyse de prédiction de structure secondaire *in silico* que GR a le potentiel d'interagir avec environ 20% de tous les transcrits (199). Il s'agit donc d'un nouvel outil dont jouit GR pour imposer son action anti-inflammatoire.

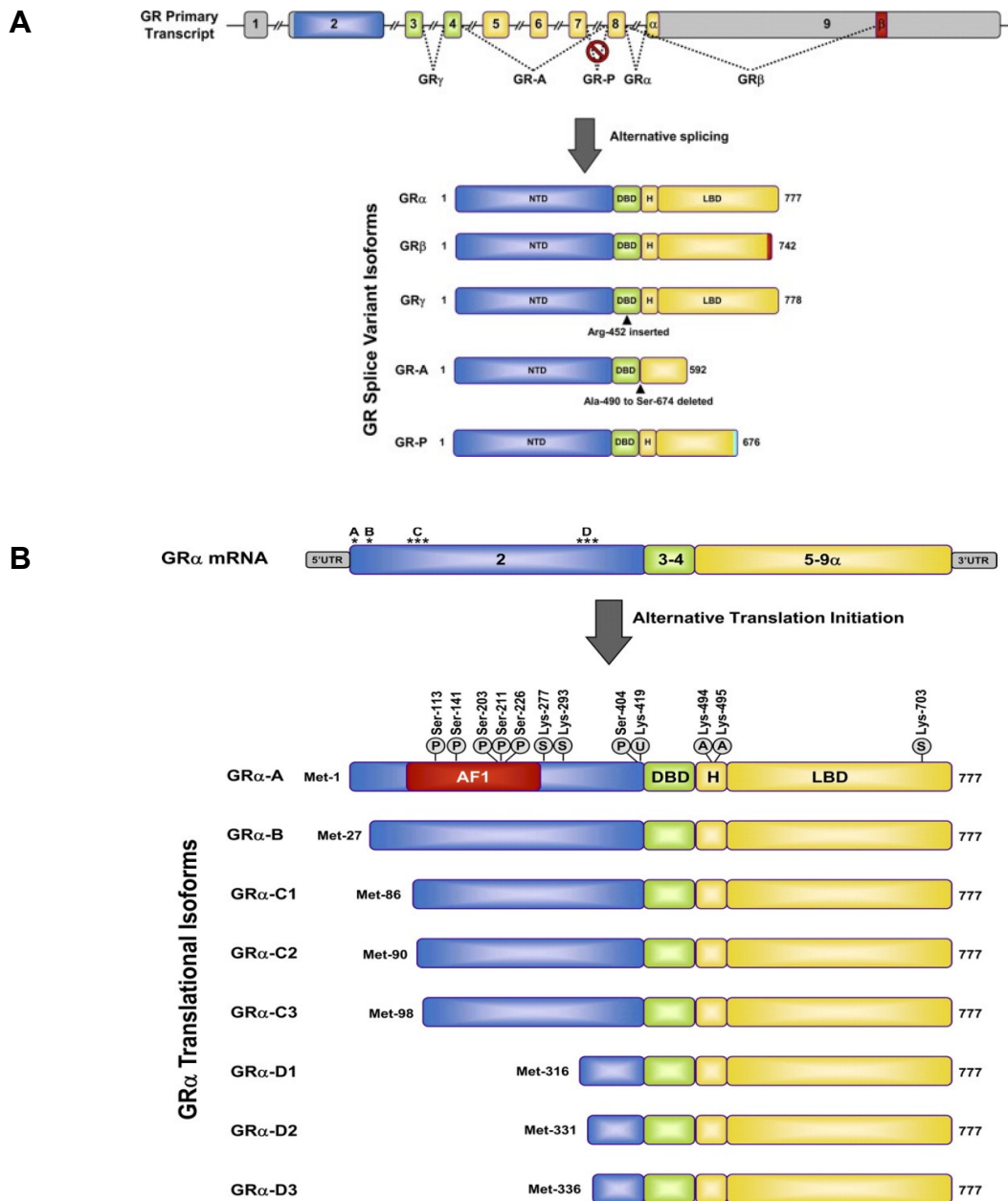
#### **1.3.3.6. Structure du récepteur**

Le facteur de transcription GR dérive d'un gène de 9 exons chez l'humain (les exons 2 à 9 codent pour la protéine) et de 8 exons codants chez la souris. Cette protéine est constituée de 4 domaines principaux: 1) la partie amino-terminale contient le domaine AF-1 qui permet la transactivation; 2) la partie centrale contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD); 3) la partie carboxy-terminale est faite du domaine de liaison du ligand (LBD) et; 4) du domaine de transactivation AF-2 (revue dans (200)).

#### **1.3.3.7. Les différents isoformes du récepteur**

L'étude intensive de l'expression du gène humain a démontré la présence de multiples isoformes découlant de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager (201). La forme principale est GR $\alpha$  qui est constituée de 777 acides aminés, tandis que GR $\beta$  a 742 aa dû à un épissage alternatif du dernier exon. Les deux protéines sont identiques pour les premiers 727 aa, mais divergent après ce point: GR $\alpha$  a 50 aa, tandis que GR $\beta$  contient 15 aa différents (Figure 1.10A). Cette différence est très importante puisqu'elle affecte la fonctionnalité du LBD. GR $\alpha$  est exprimé de façon ubiquitaire, tandis que GR $\beta$ , avec son LBD défectif, est exprimé de façon beaucoup plus sélective et se retrouve dirigé directement au noyau (155). Ce dernier est incapable d'activer directement l'expression de gènes rapporteurs sous le contrôle d'un GRE. Cependant, lorsque GR $\beta$  est exprimé de façon concomitante avec GR $\alpha$ , il agit en tant que dominant négatif tant pour ses fonctions

activatrices que répressives. Ainsi, il est proposé que le ratio d'expression entre GR $\alpha$  et GR $\beta$  permettrait de contrôler le niveau de sensibilité de la cellule aux Gc. Il a été démontré que certains signaux pro-inflammatoires (ex: TNF- $\alpha$  et IL1) induisent sélectivement l'expression de GR $\beta$ , rendant ainsi les cellules plus résistantes aux Gc (202). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que des patients avec des formes résistantes aux Gc d'asthme, d'arthrite rhumatoïde, de lupus érythémateux disséminé, de colite ulcéreuse, de leucémie lymphoblastique aigüe et chronique présentent des taux élevés de GR $\beta$  (203). Plus récemment, une étude de transcriptomique a révélé que GR $\beta$  régule, par lui-même, un groupe de gènes distinct de celui de l'isoforme  $\alpha$  (204).



**Figure 1.10.: Différents isoformes du récepteur aux glucocorticoïdes.**

A) Schéma des isoformes connus de GR découlant de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. B) Schéma des différents isoformes de GR $\alpha$  générés suite à l'utilisation de sites variés d'initiation de la traduction. Les mêmes isoformes ont été décrits pour GR $\beta$  et pourraient être produits pour les autres isoformes d'épissage, mais cela n'a pas été étudié. Figures tirées de (205).

Il existe d'autres isoformes créés par des événements d'épissage alternatif, dont GR $\gamma$  qui contient une arginine supplémentaire entre les deux doigts de zinc du DBD à cause de l'utilisation d'un site donneur d'épissage alternatif dans l'intron 3 (Figure 1.10A) (205). Cet isoforme lie efficacement les Gc et l'ADN, mais active moins efficacement des GRE en transfection. Néanmoins, GR $\gamma$  est recruté aussi efficacement que GR $\alpha$  sur des sites de liaison génomique et permet l'activation d'un répertoire de gènes qui recoupe celui de GR $\alpha$ , tout en ayant certaines cibles préférentielles (150). L'étude effectuée dans la présente thèse utilise des réactifs qui ne distinguent pas les principaux isoformes de GR.

Ces isoformes peuvent également se présenter sous des formes tronquées, à cause de l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la traduction (Figure 1.10B). Par exemple, les 8 isoformes de GR $\alpha$  sont capables d'activer de façon dose-dépendante des gènes rapporteurs contenant des GRE, mais avec des efficacités différentes. Des expériences de profilage d'expression ont démontré qu'ils ont plusieurs gènes cibles en commun, mais aussi des cibles spécifiques. La distribution des différents isoformes à travers les tissus varie grandement, ce qui pourrait ajouter un niveau de régulation dans le contrôle du répertoire histospécifique des gènes contrôlés par les Gc (206). De nombreuses autres études seront nécessaires pour comprendre le rôle de chacun de ces isoformes dans le contrôle de l'homéostasie et le développement de certaines maladies.

En plus de ses différents isoformes résultant d'épissage et de traduction alternatifs, l'expression de GR est régulée par des promoteurs alternatifs. Il a été postulé que l'utilisation différentielle de ces différents promoteurs permet un contrôle serré de l'expression histospécifique et temporelle de GR. Dans ce contexte, promoteur alternatif signifie exon 1 alternatif. Une étude récente a démontré que parmi les 14 sites d'initiation de la transcription prédits pour *GR* chez la souris, 11 sont exprimés à des niveaux variables selon les tissus et les types cellulaires (207). Il en va de même pour *GR* chez le rat et l'humain. De plus, certains signaux développementaux et hormonaux permettent d'induire spécifiquement certains messagers. Ceci génère des 5'-UTR ayant des séquences, mais

surtout des structures secondaires complètement différentes. L'efficacité traductionnelle et la demi-vie de ces messagers sont étroitement liées à la structure secondaire des 5'-UTR (207). En bref, l'expression de la protéine du récepteur aux glucocorticoïdes est contrôlé à de multiples niveaux. Ces régulations de l'utilisation alternative de sites d'initiation de la transcription, de sites d'épissage et de sites d'initiation de la traduction permet certainement une régulation serrée et importante de l'effet biologique de Gc.

#### **1.3.3.8. Les modifications post-traductionnelles**

Le contrôle de l'activité de ces différents isoformes est également assuré par l'ajout de modifications post-traductionnelles (Figure 1.10B). La raison d'être de ces modifications, c'est-à-dire la provenance des signaux qui permettent leur ajout, et la fonction des modifications post-traductionnelles ne sont pas complètement comprises. D'autant plus que le nombre de type de modifications s'accroît d'année en année. Voici un catalogue non exhaustif des modifications connues.

GR comporte six résidus sérine pouvant être phosphorylés (S113, S114, S203, S211, S226 et S404). Le niveau basal de phosphorylation de GR est accru suite à sa liaison avec les Gc et celui-ci affectent ses capacités transcriptionnelles. L'ajout de cette modification sur la sérine 211 qui est située dans le domaine de transactivation AF1 est positive pour son activité, puisqu'elle accentue son interaction avec certains cofacteurs, dont la sous-unité du complexe médiateur Med14 (208). Par ailleurs, la phosphorylation de la sérine adjacente (S216) inhibe l'action de GR. Il en va de même pour la S404 qui, une fois phosphorylée, inhibe ses fonctions activatrice et transrépressive en interférant dans l'interaction avec CBP/p300 et NFκB, respectivement (209). Quant à elle, une S203 phosphorylée induit une rétention cytoplasmique de GR. Il a également été démontré que le niveau de phosphorylation contrôle le niveau d'expression du récepteur en influençant sa demi-vie (210). La dégradation de GR est aussi induite par l'ubiquitination d'une lysine localisée dans un motif de dégradation PEST et la sumoylation des résidus K277, K293 et



K703. La capacité de transrépression sur NFκB est également affectée par l'acétylation des lysines 494 et 495 (205). En somme, les opportunités qu'ont les cellules de générer des dizaines de transcrits et d'isoformes de GR, tant par des mécanismes d'épissage alternatif, de sites alternatifs d'initiation de la transcription ou de la traduction et par des modifications post-traductionnelles, sont autant de possibilités de contrôler les niveaux d'expression de GR et les capacités fonctionnelles des Gc. Il est essentiel pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme que la réponse aux glucocorticoïdes circulants soit histospécifique. Il n'en tient qu'à nous d'en comprendre toutes les subtilités pour ensuite influencer correctement et avec doigté cette voie métabolique cruciale. Une façon d'y arriver pourrait être l'utilisation de molécules permettant de contrôler sélectivement les différentes actions de GR.

#### **1.3.3.9. Les ligands**

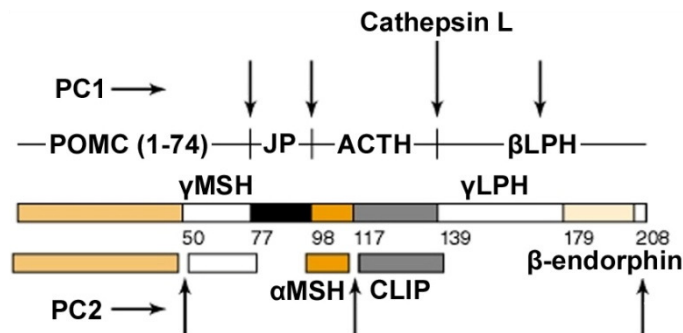
Le poche de liaison du LBD de GR est capable d'accommoder plusieurs ligands, naturels ou synthétiques. Par contre, leur effet sur l'activité de GR peut varier grandement. Les glucocorticoïdes naturels, tel que le cortisol, la corticostérone et l'hydrocortisone lient le LBD de façon transitoire et réversible, ce qui souscrit à l'importance biologique de la sécrétion pulsatile de ces Gc. Par contre, les ligands synthétiques souvent utilisés en pharmacologie (dexaméthasone, prednisone, béclo méthasone, etc.) ne quittent pas le LBD et provoque une activation soutenue de GR (31). Ceci permet d'avoir des effets pharmacologiques importants qui sont souvent peu sélectifs.

De nombreux analogues synthétiques des Gc ont été développés dans les dernières décennies. Le défi actuel est d'identifier parmi ceux-ci, des ligands permettant un contrôle sélectif de l'action de GR, ce qui n'est pas une tâche facile compte tenu des actions pléiotropiques de GR. La mifépristone ou RU486, découverte en 1981, est aujourd'hui utilisée comme traitement anti-progestatif permettant des arrêts en début de grossesse, et pour ses effets anti-Gc dans le traitement du syndrome de Cushing (211). Le RU486 se lie au LBD et permet la translocation nucléaire de GR, par contre il est connu pour inhiber son

effet transcriptionnel (212). En fait, des études récentes indiquent qu'il serait plutôt un agoniste de GR, mais ayant un potentiel d'activation plus faible, il compétitionne avec les ligands naturels. Ainsi tout comme la progestérone, RU486 serait un agoniste partiel de GR, probablement dû à une conformation non-optimale du LBD qui engendre une liaison plus faible au GRE (213). D'autres molécules analogues semblent avoir des effets antagonistes complets. Par exemple, le ORG 34517 empêche la translocation nucléaire de GR. En opposition à cet antagoniste complet, certains analogues plus sélectifs seraient utiles. Par exemple, le ZK98296 est complètement incapable de transactiver un gène rapporteur, mais permet à GR de conserver sa capacité de transrépression, possiblement parce que ce composé inhibe la dimérisation de GR qui est inutile pour son action transrépressive (168). En somme, le développement de Gc de synthèse pourrait nous donner des outils pharmacologiques pour cibler certaines fonctions spécifiques de GR dans diverses pathologies et de mieux comprendre son rôle.

## 1.4. L'ACTH et son précurseur

L'adrénocorticotropine est générée à partir de son précurseur la pro-opiomélanocortine (POMC) par la pro-protéine convertase 1 (PC1). Cette enzyme est co-exprimée avec la PC2 dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire. Les multiples sites de reconnaissance de ces deux protéases permettent de générer plusieurs petites hormones peptidiques biologiquement actives, dont l'ACTH, l' $\alpha$ -MSH et la  $\beta$ -endorphine (Figure 1.11) (214;215). Outre l'implication des convertases PC1 et PC2 dans le clivage, il a été démontré que dans les vésicules de sécrétion, la Cathepsine L de type cystéine protéase revêt une importance capitale dans la production de ces trois hormones. En effet, l'invalidation de cette protéase provoque une réduction d'au moins 75% de la production d'ACTH, d' $\alpha$ -MSH et de  $\beta$ -endorphine dans l'hypophyse (216). La production d'ACTH est restreinte aux cellules corticotropes et l' $\alpha$ -MSH aux mélanotropes.



**Figure 1.11.: Dérivés de la POMC créés par clivages protéolytiques.**

Les cellules corticotropes expriment uniquement la pro-protéine convertase 1 (PC1) et clive la POMC en ACTH. Les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire expriment autant PC1 que PC2, ce qui provoque un clivage supplémentaire de l'ACTH pour générer l' $\alpha$ -MSH. Figure adaptée de (217)

### 1.4.1. Régulation transcriptionnelle histospécifique du gène de la POMC

Le gène de la *POMC* a une expression histospécifique rigoureusement contrôlée. Son expression est restreinte aux cellules mélanotropes et corticotropes hypophysaires, à un

petit groupe de neurones hypothalamiques et aux kératinocytes de la peau. Puisque le lobe intermédiaire est absent chez l'humain, les cellules de la peau produisent localement de l' $\alpha$ -MSH et l'ACTH1-17 pour contrôler la production de mélanine et ainsi moduler la pigmentation de la peau et des poils par l'entremise du récepteur MC1R qu'exprime les mélanocytes (218). Des variations alléliques de MC1R sont très souvent associées avec une pigmentation rousse des poils et un teint pâle (219). Cette fonction de contrôle de la pigmentation est principalement assurée par le lobe intermédiaire chez les autres mammifères. Les facteurs responsables de l'expression histospécifique de la POMC dans la peau sont bien peu définis.

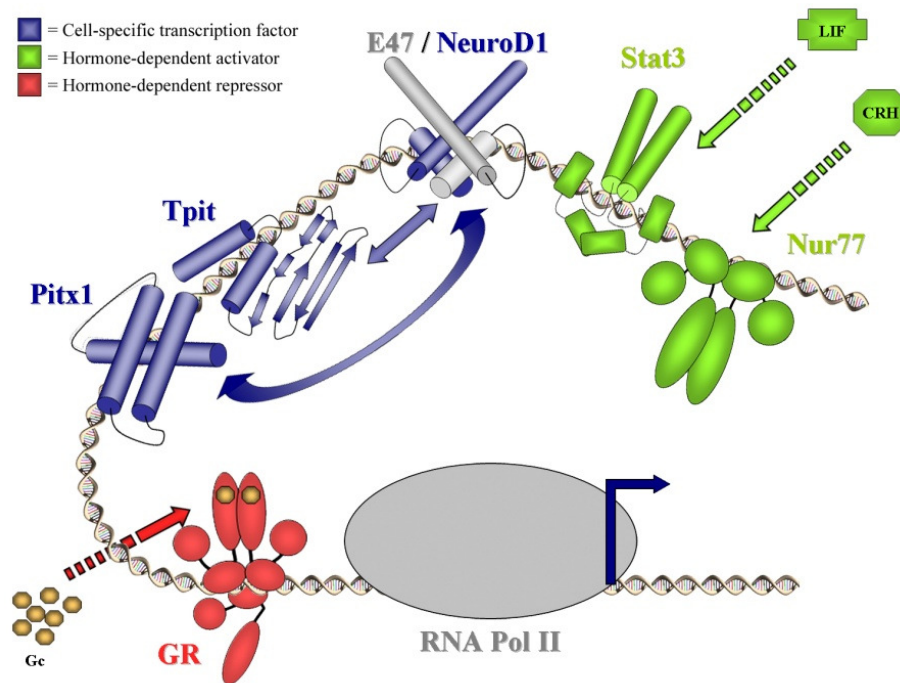
Par opposition, l'histospécificité de l'expression dans les neurones POMC est mieux décrite. L'utilisation de multiples souris transgéniques a permis d'identifier deux séquences régulatrices (enhancers) situées à 12 et 10 Kb en amont du site d'initiation de la transcription (TSS) (220;221). Les rôles inférés aux neurones POMC sont principalement une influence sur l'axe reproducteur, l'utilisation de l'énergie et sur l'obésité (222;223). Les peptides MSH ( $\beta$  et  $\gamma$ ) régulent le poids corporel via leur action sur les récepteurs MC3R et MC4R (224). En effet, des mutations de MC4R sont découvertes chez 3% des patients atteints d'obésité morbide (225). Par ailleurs, une mutation perte de fonction dans le gène de la *POMC* cause des dérèglements qui englobent toutes les fonctions discutées plus haut. Les signes majeurs sont une pilosité rousse, de l'obésité extrême et précoce, et des taux de cortisol sanguin très bas (226). Les souris dont le gène *Pomc* a été invalidé présentent les mêmes symptômes, soit une pigmentation du poil altérée, de l'obésité et une insuffisance surrénalienne (227).

Sur le plan hypophysaire, l'expression mélano-cortico-spécifique a été clairement attribuée à une courte région régulatrice représentant le promoteur proximal (-480 à +63 chez le rat) (228-230). Lorsque cette région régulatrice est étudiée en souris transgéniques avec un gène rapporteur fluorescent (EGFP), elle permet une expression restreinte aux

cellules POMC de l'hypophyse, avec un biais favorable pour les mélanotropes (231). Une pléiade de FT régulent ce promoteur, dont plusieurs sont impliqués dans la régulation basale de la transcription (229). Par contre, trois d'entre eux sont particulièrement importants pour son expression histospécifique, soit *NeuroD1*, *Pitx1* et *Tpit* (Figure 1.11).

Le bHLH neurogénique *NeuroD1* (BETA2) est impliqué dans la différenciation de plusieurs types cellulaires, certains types de neurones, les cellules entéroendocrines de l'intestin, les cellules photoréceptrices de la rétine et les cellules  $\beta$  du pancréas (232-235). Les souris dont le gène *NeuroD1* a été invalidé meurent rapidement d'un diabète néonatal parce que les cellules  $\beta$  productrices d'insuline sont absentes (234). L'expression corticotrope de *NeuroD1* n'est pas aussi critique à leur différenciation. Néanmoins, il se retrouve sur la région distale du promoteur de la *Pomc*, sur un élément de réponse nommée  $E_{box_{neuro}}$  (Figure 1.11). Pour permettre sa liaison et l'activation de cette région, il doit obligatoirement hétérodimériser avec un bHLH ubiquitaire, par exemple *E47/Pan1* (23). La  $E_{box_{neuro}}$  engendre une activité transcriptionnelle synergique avec un TFBS situé dans la région centrale du promoteur qui est lié par le facteur à homéodomaine *Pitx1*. Cette activation synergique est imputable à une interaction protéine:protéine entre *Pitx1* et la moitié ubiquitaire de l'hétérodimère étant recrutée à la  $E_{box_{neuro}}$ . La mutation d'un de ces deux éléments de réponse abolit plus de 80% de l'activité du promoteur sur la transcription d'un gène rapporteur dans des expériences de transfection (24). De façon consistante, la mutation de la  $E_{box_{neuro}}$  provoque une perte radicale de l'activité du promoteur au cours du développement et à l'état adulte chez des souris transgéniques, et ce tant au niveau corticotrope que mélanotrope, bien que *NeuroD1* ne soit pas exprimé dans le LI (231). Malgré le léger phénotype provoqué par la perte de *NeuroD1* chez la souris, ces expériences de mutagenèse renforce l'hypothèse d'une redondance entre *NeuroD1* et d'autres bHLH neurogéniques, permettant ainsi l'expression adéquate du gène de la *Pomc*.

La distribution tissulaire de l'expression des FT NeuroD1 et Pitx1 ne permet pas à elle seule d'expliquer le caractère très restrictif de l'expression de la POMC. L'analyse des TFBS possibles dans le promoteur de la *Pomc* a permis d'identifier une séquence apparentée à la moitié d'un site de liaison palindromique permettant le recrutement du facteur à boîte T Brachyury (236). Grâce à cette information, le laboratoire a cloné, à l'aide de PCR utilisant des oligos dégénérés, un nouveau FT à boîte T: Tpit (Tbx19). Il s'est avéré que Tpit a un patron d'expression confiné aux cellules mélanotropes et corticotropes. De plus, il est un contributeur majoritaire à l'expression de la POMC et à la différenciation terminale des cellules POMC hypophysaires (13). Par contre, Tpit a une affinité très faible pour l'ADN lorsqu'il est en monomère, mais la proximité de son site de liaison avec celui de Pitx1 lui permet de former un hétérodimère qui active synergiquement le promoteur (Figure 1.12). Le recrutement de Tpit sur le Tpit/PitxRE est donc dépendant de la présence de Pitx1 (13). Ainsi toutes les expériences du laboratoire depuis plus de 25 ans ont permis de démontrer que ce trio de FT est responsable de l'expression hypophysaire de la POMC. Le chapitre 2 de cette thèse apporte un éclairage nouveau sur l'expression histospécifique de la POMC et sur le mécanisme de recrutement à l'ADN de Tpit, grâce à l'identification d'un enhancer cortico-préférentiel situé à 7 Kb en amont de *Pomc*.



**Figure 1.12.: Facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression histospécifique et hormonal de la *Pomc*.**

#### 1.4.2. Contrôle hormonal du gène de la POMC

Étant l'élément central de l'axe HPA, l'ACTH doit être régulé finement et intégrer divers messagers biologiques pour être en mesure d'exercer son action correctement. Ainsi, le promoteur de la *POMC* est constitué de plusieurs éléments de réponse à des FT lui permettant de réagir promptement aux signaux extérieurs. Bien que cette petite région promotrice soit étudiée de façon intensive par plusieurs groupes depuis plus de deux décennies, de nouveaux mécanismes de régulation sont encore mis à jour. Récemment, l'identification du recrutement d'un hétérodimère LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  dans la région proximale du promoteur apporte un lien direct entre le métabolisme des lipides et l'activation des cellules corticotropes (237). En outre, les principales régulations hormonales appliquées à la transcription de la *Pomc* sont l'activation par la CRH hypothalamique et les cytokines pro-inflammatoires, ainsi que la répression par les Gc.

### 1.4.2.1. Activation par la corticolibérine

La CRH libérée par les neurones hypothalamiques est le principal moyen qu'utilise l'axe HPA pour activer la production d'ACTH. Ses effets sur la transcription de la *Pomc* sont induits suite à sa liaison aux récepteurs à la CRH (CRHR1 et CRHR2). Ces récepteurs font partie de la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (238). Lorsque le récepteur reçoit la CRH via le système porte hypophysaire, une production rapide d'AMPc s'en suit. Ce second messenger permet l'activation de la protéine kinase A (PKA), une sérine/thréonine kinase (239;240). Cette enzyme cytoplasmique est impliquée dans l'activation de la voie MAP (*Mitogen activated protein*) kinase et dans l'augmentation du niveau d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques via les canaux calciques de type L. Cet accroissement de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  induit la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, libérant donc dans la circulation sanguine l'ACTH préalablement accumulée (241).

L'activation transcriptionnel de la POMC par la CRH est majoritairement assurée par les récepteurs nucléaires orphelins de la famille des Nur: Nur1 (MINOR, NR4A3), Nurr1 (TINUR, NR4A2) et principalement Nur77 (NGFI-B, NR4A1). Ces récepteurs ont une structure semblable aux autres récepteurs nucléaires, c'est-à-dire qu'ils contiennent des domaines de transactivation AF-1 et AF-2, un DBD et un LBD, mais ils sont dits orphelins parce qu'ils fonctionnent indépendamment de ligands (242). Leur séquence peptidique est divergente dans la région amino-terminale, mais ils arborent une grande homologie de séquence dans leur région carboxy-terminale et leur DBD. Ainsi, ils reconnaissent les mêmes motifs de liaison sur l'ADN, mais ont un potentiel de transactivation possiblement différent (243). Également, les trois membres de la famille présentent des patrons d'expression qui sont à la fois distincts et partiellement redondants (244). Malgré que la structure cristallographique du LBD suggère fortement qu'il sont incapables de lier un ligand, un ligand naturel a récemment été identifié pour Nur77 (245). Effectivement, la cytosporone B, produite par des champignons endocytiques, lie spécifiquement le LBD de Nur77 et ainsi active ses cibles transcriptionnelles via l'action de SRC1 et SRC2 (246).



Nur77 a été impliqué à tous les niveaux de l'axe HPA, tant dans les neurones hypothalamiques, les cellules corticotropes, que le cortex surrénalien (247;248). En condition basale, Nur77 a une localisation tant cytoplasmique que nucléaire, mais il est inactif parce qu'un groupement phosphate présent sur la sérine 316 située dans le DBD l'empêche de lier l'ADN. La mise en marche de la voie PKA et MAPK permet la déphosphorylation de la sérine 316 et la phosphorylation du domaine AF-1, ce qui permet la dimérisation des facteurs Nur, leur liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle (249;250). Bien que les Nur soient recrutés sous forme monomérique dans la région proximale du promoteur sur le NBRE (AAAGGTCA), l'induction de la POMC par la CRH passe majoritairement par la liaison de dimères, contenant au moins une molécule de Nur77, dans la région distale du promoteur sur le NurRE (Figure 1.12). Cette séquence est formée de deux séquences apparentées au NBRE et disposées de façon éversées (249). Les coactivateurs de type p160 (principalement SRC2) sont ensuite recrutés au promoteur de façon CRH-dépendante via le domaine AF-1 des Nur, mais également par l'entremise de Tpit (250;251). En plus du co-recrutement de SRC2 (TIF2), Nur77 et Tpit interagissent physiquement et de façon synergique pour induire le promoteur POMC (251). Les protéines apparentées à Rb (Rb et p107) favorisent l'activation par la CRH grâce à son recrutement au promoteur via une interaction directe avec Nur77 et SRC2 (252). La stimulation par la CRH induit également le recrutement de TIF1 $\beta$ /KAP1 sur Nur77. Dans cette condition, il agit à titre de coactivateur alors qu'il est généralement connu pour avoir une action répressive (253). D'autres FT ayant une importance minoritaire ont été réputés participer à l'action de la CRH, plus particulièrement via l'activation du facteur CREB et de AP-1 qui sont recrutés à son élément de réponse dans le début de l'exon 1 de la *Pomc* (254;255). En addition à l'action de CRH, la cytokine pro-inflammatoire IL1 augmente l'activité de Nur77 par l'entremise de la protéine kinase p38 (256). IL1 induit également la production de LIF et IL6 par les cellules corticotropes dont la fonction a été attribuée à une régulation auto/paracrine de l'activité corticotrope (257).

#### 1.4.2.2. Activation par LIF

La présence de cytokines pro-inflammatoires dans le sang est ressentie par les cellules corticotropes, la résultante est l'induction de la transcription de la *Pomc* et la libération d'ACTH. Il existe un synergisme important entre ces cytokines et la voie CRH dans l'activation de l'axe HPA. Premièrement, il induisent la production/libération de la CRH, mais également des cytokines LIF/IL6 par les neurones hypothalamiques. De façon importante, les cytokines membres de la famille IL6 activent directement la transcription de la *Pomc*, par l'intermédiaire de la voie de signalisation Jak-Stat. De la famille IL6 de cytokines (IL6, LIF, oncostatine M, interleukine 11, "ciliary neurotrophic factor" et cardiotrophine 1), LIF est celle qui induit le plus fortement les corticotropes. Ces interleukines sont reconnues par un récepteur hétérodimérique transmembranaire qui est constitué de la portion commune et ubiquitaire gp130, de même qu'une portion spécifique à chacun des membres de la famille, dans le cas présent le récepteur à LIF (LIFR) (258). L'association de LIF avec le récepteur LIFR provoque la dimérisation avec la sous-unité transactivatrice gp130 et il s'en suit une série de phosphorylations. La Janus tyrosine kinase (Jak) s'auto-phosphoryle pour ensuite phosphoryler son partenaire gp130, ce qui crée un site d'ancrage pour des protéines ayant un domaine SH2, comme les Stat. Ainsi, cette JAK activée devient en étroite proximité et phosphoryle Stat1 et/ou Stat3 sur un résidu tyrosine, Y<sup>701</sup> et Y<sup>705</sup> respectivement. L'ajout de ce groupement phosphate permet une homo ou hétérodimérisation, ainsi que la translocation nucléaire de Stat1/3 qui peuvent maintenant lier l'ADN (101;259;260). Le motif de reconnaissance à l'ADN est un élément de 9 pb, le SBE (*Stat binding element*) dont la séquence consensus est TTCCGGGAA.

Parmi les milliers de site de liaison de Stat3 dans le génome, deux sont dignes de mention. Premièrement, comme plusieurs facteurs de transcription, Stat3 lie sont propre promoteur pour auto-activer sa transcription. Le second est *Socs3* (*suppressor of cytokine signaling*) dont le locus est parsemé d'une vingtaine de sites de Stat3, dont un au promoteur a été bien décrit dans la cellule corticotrope. Suite à une stimulation LIF, la transcription de *Socs3* augmente de façon drastique (261). L'augmentation rapide du niveau de *Socs3*

permet, comme son nom l'indique, de freiner l'activation de la voie Jak-Stat. Par son domaine SH2, Socs3 interagit avec le site d'autophosphorylation des Jak et ainsi bloque son potentiel activateur (262;263). Par conséquent, l'activation de Socs3 en réponse à LIF constitue un autre moyen de limiter et contrôler le niveau de production de la POMC (264).

Au promoteur *Pomc*, l'action de LIF/Stat3 a été attribuée à deux régions (265). La position du site actif dans la région proximale n'a pas été déterminée, mais dans la région distale, Stat3 lie un SBE qui est partiellement superposé au NurRE pour former l'élément NurRE-STAT (265-268). L'organisation spatiale de cet élément permet effectivement le co-recrutement de Nur77 et Stat3, tel que montré grâce leur structure cristallographique (266). La synergie entre ces deux facteurs semble être grandement dépendante du co-recrutement par des interactions protéine:protéine du facteur CREB, donc ce dernier ne lie pas directement l'ADN. En effet, l'abolition du site de phosphorylation S<sup>133</sup> qui est normalement activé par la CRH via la PKA, l'utilisation d'un dominant négatif de CREB ou son invalidation par un siRNA spécifique abroge presque complètement la synergie CRH/LIF sur le NurRE-STAT (266). Par contre, la mutation de ce site n'affecte que partiellement la réponse du promoteur à LIF, indiquant que le site proximal ou d'autres FT pourraient être impliqués (cette éventualité sera discutée dans la discussion au chapitre 5). Il est également à noter que l'action de LIF est indépendante de la voie AMPc (258). Malgré qu'il ne s'agit vraisemblablement pas d'intercommunication directe entre les voies CRH et LIF, cette dernière accroît rapidement la transcription de c-fos et de JunB formant le dimère AP-1 dont la liaison est induite par le CRH. Des expériences de mutagenèse indiquent que le site AP-1 de l'exon 1 contribue environ à 20% de la réponse du promoteur à LIF et/ou CRH, alors que le NurRE-STAT fait environ 50% du travail (269). Il est donc vraisemblable que d'autres FT ou région du promoteur soient impliqués dans la réponse à LIF. Il a été montré que la stimulation LIF induit la transcription et l'activité de C/EBP $\beta$ , en retour celui-ci active la transcription de *Pomc* (270). Par contre, le ou les site(s) d'action de C/EBP $\beta$  sur le promoteur *Pomc* n'ont pas été identifiés (voir le chapitre 5 pour des pistes de solution).

### 1.4.2.3. Répression par les glucocorticoïdes

La rétro-inhibition du gène *Pomc* par les Gc est fondamental dans le contrôle adéquat de l'axe HPA et en résultante, du contrôle des stress. Les tumeurs corticotropes hypophysaires perdent très souvent cette sensibilité aux Gc, ce qui engendre les symptômes associés à la maladie de Cushing. Le laboratoire a identifié deux mécanismes différents permettant la répression du promoteur par GR.

Le site proximal de liaison monomérique des facteur Nur (NBRE) chevauche un élément qui est impliqué *in vitro* dans la répression du promoteur par les Gc. Ce site, appelé nGRE pour *negative GRE*, recrutement GR sous une forme trimérique (158;271). Le mécanisme par lequel GR exerce son action répressive sur ce site n'est toujours pas élucidé. Une hypothèse serait par une compétition avec les Nur pour l'espace lui permettant de lier cette région. Bien que ceci soit possible, la contribution du NBRE à l'activité du promoteur est minime. Néanmoins, les souris GR<sup>dim/dim</sup> exprimant un GR déficient dans sa capacité de dimériser, donc de lier le nGRE, affichent une réduction de rétro-inhibition des Gc au niveau hypophysaire (169). Ainsi, il semble que le nGRE ait une certaine contribution biologique dans cette boucle de rétroaction.

Le second mécanisme implique la transrépression de Nur77 par GR au niveau du NurRE situé dans la région distale du promoteur (272). Tout comme pour le *tethering* sur NF- $\kappa$ B et AP-1, GR est recruté sur Nur77 par contact protéine:protéine sous forme monomérique. L'antagonisme de GR s'exerce sur les trois membres de la famille Nur et leur interaction est médiée par leur DBD respectif, bien que la liaison de GR à l'ADN ne soit pas en cause (273). Cette interaction est stabilisée par le recrutement de Brg1, la sous-unité ATPase du complexe de remodelage de la chromatine Swi/Snf (153). Bien que Brg1 soit constitutivement associé au promoteur, il est requis pour l'assemblage Gc-dépendant du complexe corépresseur contenant GR et HDAC2. Le recrutement de HDAC2 induit une

déacétylation de l'histone H4 sur le promoteur *Pomc* qui semble essentielle puisque l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC abroge la transrépression des Gc et à de fortes concentrations, le promoteur devient activable par les Gc (153). L'importance des molécules impliquées dans ce complexe transrépresseur fut confirmée par la perte de leur expression chez des tumeurs corticotropes (canines et humaines) résistantes à la rétro-inhibition des Gc étant causal de la maladie de Cushing (153). En somme, les Gc n'affectent pas le recrutement des facteurs tels que Stat3, Nur77, de même que des coactivateurs (TIF1 $\beta$  et SRC2), mais semblent plutôt modifier la composition des complexes corégulateurs pour modifier l'activité de certains ou pour y inclure des molécules répressives (HDAC2).

Le promoteur *Pomc* constitue une exception dans la régulation transcriptionnelle, puisque le niveau de base de son expression est extrêmement élevé, alors tous les signaux l'affectant tentent d'influencer cet état d'activation. D'autres FT ou corégulateurs seront certainement associés avec le contrôle du niveau de base, de l'activation de LIF et CRH, de la répression Dex, mais également avec les nombreux autres signaux affectant la transcription de la *Pomc*. Les dernières avancées technologiques dans l'analyse des fragments de ChIP nous permet de localiser avec une précision sans précédent les protéines associées avec la chromatine. Elles ont entre autres permis d'identifier un nouvel enhancer cortico-préférentiel de la *Pomc* situé à -7 Kb de son TSS (voir le chapitre 2). Mes investigations de ChIP-seq de Stat3 et GR m'ont également permis de soulever de nouvelles hypothèses sur la régulation du promoteur *Pomc* par ces voies de signalisation (voir le chapitre 5).

## 1.5. Hypothèses et objectifs

Les cellules corticotropes de l'adénohypophyse exercent une fonction capitale au centre de l'axe HPA pour le maintien de l'homéostasie en réponses aux stress qui nous affligent. L'organisation tissulaire des corticotropes fait qu'elles sont constamment exposées aux signaux transportés dans le flot sanguin en plus de molécules provenant d'une sécrétion paracrine. Nous savons que ces cellules réagissent prestement à de multiples signaux pour le contrôle de la sécrétion et de la transcription de *Pomc*. Par contre, outre l'activation de la transcription de *Pomc* par la CRH hypothalamique et les cytokines pro-inflammatoires, la rétro-inhibition par les Gc surrénaliens et l'importance de certains facteurs dans la cascade développementale, nous connaissons bien peu de chose de la biologie de ces cellules essentielles.

La ligne directrice de mes travaux de doctorat présentés dans cet ouvrage fut d'investiguer la réponse globale des cellules corticotropes face à la cytokine pro-inflammatoire LIF et aux glucocorticoïdes. Un pan important de ces travaux voulait également comprendre l'interaction entre ces deux voies. L'avancement rapide des technologies nous permet d'aborder nos questions de façon très différente de la biologie moléculaire classique. J'ai opté pour l'utilisation de techniques génomique permettant l'analyse simultanée de tous les changements qui s'opèrent dans la cellule. Ainsi, à l'aide d'un modèle de corticotropes en culture, j'ai observé les modifications d'expression génique grâce à des micropuces d'ADN en réponse à ces deux stimuli, individuellement ou en combinaison. De façon inattendue, cette étude dans les cellules corticotropes, m'a permis d'identifier un mécanisme de défense mis en branle par toutes les cellules de l'organisme et qui est activé de façon synergique par les voies LIF/Stat3 et Gc/GR. Cette réponse pléiotropique s'ajoute à la réponse immunitaire innée afin de défendre notre organisme.

J'ai ensuite exploré les mécanismes moléculaires sous-jacents aux interrelations entre ces voies par une technique d'immunoprécipitation de chromatine couplée avec l'hybridation sur des micropuces d'ADN (ChIP-chip) ou au séquençage massif des

fragments d'ADN recueillis (ChIP-seq). Le ChIP-chip de Stat3 sur des puces couvrant entièrement le génome a révélé que ce FT lie une pléiade de sites, mais de façon surprenante il est recruté sur un élément de réponse situé à 7 Kb en amont de *Pomc*. Bien que des publications antérieures utilisant des souris transgéniques ne laissait pas présager que cette séquence puisse avoir une quelconque activité régulatrice, j'ai voulu y voir plus clair. Contre toute attente, cette région s'est avérée avoir une activité hautement histospécifique aux cellules POMC hypophysaires avec un biais significatif envers les cellules corticotropes. Cette séquence mobilise les mêmes facteurs que le promoteur, à l'exception de Pitx1 qui est un partenaire obligatoire de Tpit au promoteur. En fait, l'activité de cette séquence est dépendante du recrutement d'un homodimère de Tpit étant attaché au premier site palindromique naturel pour un facteur à boîte T.

L'identification des sites de liaison de Stat3 et GR par la méthode très sensible qu'est le ChIP-seq, m'a permis d'explorer les interactions entre ces facteurs au niveau de la chromatine. L'activation synergique de plusieurs gènes et l'antagonisme qu'exercent LIF et Gc sur la *Pomc* était suggestive de régulations complexes. En effet, j'ai pu mettre à jour les différentes modalités que ces FT utilisent pour s'influencer. Premièrement, la synergie transcriptionnelle est attribuée à deux situations: 1) leur recrutement commun à l'ADN sur des sites à proximité (peu importe l'arrangement) et 2) le *tethering* de Stat3 sur GR. Par opposition, un antagonisme transcriptionnel est déclenché par le *tethering* de GR sur Stat3. En plus de ces effets transcriptionnels, j'ai prouvé que GR et Stat3 peuvent être recrutés à la chromatine sans contact à l'ADN et qu'il s'agit d'un mécanisme fréquemment utilisé. De plus, j'ai confirmé que la répression transcriptionnelle conduite par les Gc n'implique pas la liaison directe de GR à l'ADN. Ces interactions apportent une lumière nouvelle sur les actions pro- et anti-inflammatoires de ces deux composés essentiels à notre survie face aux agressions.

## **Chapitre 2 : A Pituitary-Specific Enhancer of the POMC Gene with Preferential Activity in Corticotrope Cells**

**Running Title: Pituitary enhancer of the POMC gene**

David Langlais<sup>1,2</sup>, Catherine Couture<sup>1</sup>, Guillaume Sylvain-Drolet<sup>1</sup>, Jacques Drouin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
Montréal QC, H2W 1R7 Canada

<sup>2</sup>Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal  
Montréal QC Canada H3C 3J7

**Precis:** A pituitary-specific enhancer identified through genomic analyses preferentially directs expression in anterior pituitary corticotropes and contains a highly-conserved target for Tpit homodimers.

**\*Corresponding author and to whom address reprint request:**

Jacques Drouin  
Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110, avenue des Pins Ouest  
Montréal QC H2W 1R7 Canada  
Tel.: (514) 987-5579; Fax: (514) 987-5575



## **2.1. Avant-propos**

### **2.1.1. Publication**

Cet article a été publié dans la revue *Molecular Endocrinology* en février 2011 (Langlais *et al.* *Mol Endocrinol.* 2011 Feb;25(2):348-59. Epub 2010 Dec 30).

### **2.1.2. Contribution des auteurs**

J'ai conçu et effectué la majorité des expérimentations et analyses bioinformatiques qui ont mené à cette publication. Guillaume Sylvain-Drolet a généré les premiers rapporteurs luciférase sous ma direction lors d'un stage d'été. Catherine Couture a fait l'expérience de retard sur gel de la figure 2.5. Elle a également participé à divers clonages visant à créer les rapporteurs et les transfections en découlant. Elle a mis un effort particulier pour le clonage ardu du locus complet de la POMC (figure 2.2A).

### **2.1.3. Contexte**

L'expression histospécifique et la réponse hormonale du gène *Pomc* dans les cellules corticotropes de l'hypophyse est contrôlée par une courte région promotrice. Cette région a été longuement étudiée par notre laboratoire et d'autres, ce qui nous a permis d'identifier une multitude de voies de signalisation et de FT qui convergent sur cette région régulatrice. La liaison concomitante de Tpit et Pitx sur l'élément Tpit/PitxRE constitue le principal mécanisme contrôlant l'expression histospécifique dans les cellules POMC hypophysaires. Par contre, l'utilisation de cette région promotrice pour contrôler l'expression de gènes rapporteurs dans des souris transgéniques nous a permis d'observer une expression préférentielle dans les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire. Historiquement, plusieurs groupes ont tenté d'identifier d'autres séquences régulatrices dans le locus *Pomc*. Les souris transgéniques découlant de troncations du locus ont mis le doigt sur deux enhanceurs situés à -12 Kb et -10 Kb contrôlant l'expression dans les neurones

POMC hypothalamiques. Par ailleurs, aucun autre enhancer ne fut découvert, que ce soit pour l'expression dans la peau ou affectant l'expression hypophysaire.

Dans le but d'étudier la réponse globale des cellules corticotropes aux cytokines pro-inflammatoires, j'ai déterminé les sites de liaison de Stat3 grâce à des expériences de ChIP-chip sur des puces couvrant complètement le génome. De façon inattendue, j'ai découvert un site de liaison situé à -7 Kb du site d'initiation de la transcription de *Pomc*. L'analyse bioinformatique de cette région nous indique qu'elle est conservée chez les mammifères et qu'elle contient des sites de liaison pour les FT étant importants pour l'activité du promoteur, à l'exception de Pitx1. En effet, tous ces FT ayant un site prédit sont recrutés. Sachant que Tpit est incapable de lier le promoteur en l'absence de Pitx1, une question s'impose : quel est le mode de recrutement de Tpit à l'enhancer? Une combinaison de ChIP, de mutagenèse sur des rapporteurs luciférase et de retard sur gel, nous a permis d'identifier le premier site palindromique naturel pour un facteur à boîte T. Ainsi, un homodimère de Tpit est associé à l'enhancer ce qui explique son indépendance à Pitx1. De plus, comme cette association avec Tpit le suggère, ce nouvel enhancer dirige une expression strictement restreinte aux cellules POMC hypophysaires. De façon intéressante, en opposition avec le promoteur, son activité affiche un biais remarquablement corticotrope. En somme, l'étude présentée dans le présent chapitre identifie une nouvelle séquence régulatrice dépendante d'un site palindromique de Tpit dirigeant une expression cortico-préférentielle du gène *Pomc*.

## 2.2. Summary

Cell-specific expression of the pituitary pro-opiomelanocortin (POMC) gene depends on the combination of tissue- and cell-restricted transcription factors such as Pitx1 and Tpit. These factors act on the proximal POMC promoter together with transcription factors that integrate inputs from signalling pathways. We now report the identification of an upstream enhancer in the POMC locus that is targeted by the same subset of transcription factors, except Pitx1. This enhancer located at -7kb in the mouse POMC gene is highly dependent on Tpit for activity. Whereas Tpit requires Pitx1 for action on the promoter, it acts on the -7kb enhancer as homodimers binding to a palindromic Tpit response element (TpitRE). Both half-sites of the TpitRE palindrome and Tpit homodimerization are required for activity. *In vivo*, the enhancer exhibits preferential activity in corticotrope cells of the anterior lobe whereas the promoter exhibits preference for intermediate lobe melanotropes. The enhancer is conserved among different species with the TpitRE palindrome localized at the center of conserved sequences. However, the mouse and human -7kb enhancers do not exhibit conservation of hormone responsiveness and may differ in their relative importance for POMC expression. In summary, pituitary expression of the POMC gene relies on an upstream enhancer that complements the activity of the proximal promoter with Tpit as the major regulator of both regulatory regions.

### 2.3. Introduction

Regulatory mechanisms for gene transcription are very flexible and many different scenarios can achieve similar outputs of transcription. In particular, recent data have beautifully illustrated the very pliable nature of regulatory sequences such as enhancers and their rapid evolution when comparing related species (1). Whereas the relative contribution of individual regulatory elements vary when comparing homologous genes between species, the nature of their building blocks, i.e. the binding sites for transcription factors, is more conserved. Indeed, it appears that the combination of transcription factor binding sites, and hence their cognate factors, is a more specific signature for individual genes and their regulatory landscape.

Consistent with this emerging picture, the identification of pituitary-restricted transcription factors has been the most instructive on mechanisms for pituitary-specific gene expression, cell differentiation and organogenesis. While most currently known transcription factors with restricted pituitary expression were initially characterized for their action on cognate binding sites within the promoters of hormone coding genes, the same transcription factors are also acting at multiple distant regulatory elements and enhancers that contribute to pituitary-specific and hormone-regulated transcription. The expression of some of these factors, such as Pitx1, Pitx2, Lhx3 and Lhx4, precede pituitary organogenesis; these factors are important from early phases of pituitary development till adulthood where they contribute to combinatorial programs for transcription of pituitary-specific genes (2). Thus, the Pitx factors were found to act as pan-pituitary transcription factors with DNA binding sites identified in regulatory sequences of all pituitary hormone coding genes (3).

Other factors exhibit expression in a subset of pituitary lineages, and accordingly were found to be required for differentiation of these lineages and for sustained expression of the corresponding hormone-coding genes. Indeed, the Prop1 and Pit1 transcription factors are critical regulators of the genetic programs for somatotrope cells expressing GH,

lactotropes expressing PRL and thyrotropes expressing TSH (4-7). Similarly, the highly lineage-restricted transcription factors Tpit and SF1 are required for terminal differentiation of the corticotrope/melanotrope and gonadotrope lineages, and for cell-specific transcription of the pro-opiomelanocortin (POMC) and gonadotropin genes, respectively (8;9). Combinations of binding sites for these cell-restricted factors together with targets of ubiquitous transcription factors such as those mediating the action of signalling pathways, are present within regulatory sequences, promoters and enhancers, that direct pituitary-specific gene expression.

The pituitary POMC gene has the unique feature of marking two different pituitary lineages, the corticotropes and melanotropes. However, transcriptional regulation and processing of the polypeptide precursor POMC is unique to each lineage (10). Pituitary transcription of POMC was shown to depend on a -480bp proximal promoter that targets *in vivo* expression in both corticotropes and melanotropes (11-15). Extensive characterization of this promoter led to the discovery of the Pitx homeobox transcription factors as well as that of Tpit. The search for other regulatory sequences of the POMC gene has led to the identification of distal upstream enhancers located at -12kb and -10kb, that are involved in hypothalamic expression of POMC (16;17). Although it reproduces the qualitative specificity of pituitary POMC expression in transgenic mice, the proximal promoter does not quantitatively reproduce expression of pituitary POMC, in particular when comparing corticotrope with melanotrope expression (12).

While using genome-wide approaches to investigate regulatory mechanisms active in pituitary corticotrope cells, we identified *in vivo* binding sites by chromatin immunoprecipitation (ChIP) for various transcription factors in an upstream region of the POMC gene that had not previously been characterized. The present report demonstrates that a region located at about -7kb upstream of transcription initiation has enhancer properties with preferential activity in pituitary corticotropes compared to melanotropes. The activity of this pituitary-specific enhancer is highly dependent on a palindromic

binding site for homodimers of the POMC lineage-restricted factor Tpit. Interestingly, comparison of -7kb POMC enhancer and promoter sequences in different species revealed a high degree of conservation for the enhancer Tpit palindrome that is not as great as the Tpit binding site of the promoter. Notwithstanding this variability of sequence conservation, both human promoter and enhancer exhibit conserved dependence on Tpit for activity, highlighting the critical importance of cell-specific transcription factors for expression. The variability of regulatory sequences is further illustrated by species differences in hormone responsiveness of the -7kb enhancer. The present report identifies a novel enhancer for pituitary-specific expression of the POMC gene and identifies species variability in the relative importance of promoters and enhancers.

## 2.4. Results

### 2.4.1 A candidate regulatory element in the POMC locus

Whole-genome ChIP-chip (chromatin immunoprecipitation analyzed on DNA microarrays) in AtT-20 cells that have corticotrope properties and express POMC, revealed two regions of Stat3 recruitment at the POMC locus (18). The most proximal peak corresponds to known Stat3 binding in the promoter region (19;20). The distal peak is located 7kb upstream of the transcription start site and coincides with a region that is well conserved in mammals (Fig. 1A). *In silico* analyses of this region for putative transcription factor binding sites (TFBS) revealed the presence of a binding motif for Stat3, but also predicted GRE sites for the glucocorticoid receptor (GR), NBRE for nuclear receptors of the Nur subfamily, E boxes that are binding sites for transcription factors of the bHLH family, and finally, a palindromic element composed of two binding sites for transcription factors of the T or brachyury family (TpitREpal and Fig. 1B). We then used ChIP to assess the presence of cognate transcription factors at the predicted sites. We confirmed the occupancy of Nurr1, GR and Stat3 after treatment with the appropriate stimuli (CRH, Dex and LIF, respectively). NeuroD1 and Tpit recruitment was also observed (Fig. 1C). It is noteworthy that these same transcription factors are present and known to be important for activity of the POMC promoter (Fig. 1D, E). A major difference is however the presence of Pitx1 at the promoter and its absolute requirement for action of Tpit (8). In contrast, there are no predicted Pitx binding sites in the -7kb region, nor is there recruitment of the protein in this region as assessed by ChIP (Fig. 1B, C). Thus, the -7kb region of the POMC locus recruits most of the transcription factors previously documented to be important for regulated expression of this gene.

### 2.4.2 The -7kb region has typical enhancer properties

In order to evaluate the properties of the -7kb putative regulatory sequences, we inserted an 832bp fragment encompassing this conserved region into a variety of luciferase

reporter plasmids. Previous work had highlighted the importance of the -480bp proximal promoter and not identified further active sequences up to -4.5kb (21;22). We thus compared the activity of a 6.9kb promoter fragment with a longer one extending to -7.7kb and encompassing the putative 832bp enhancer domain: the addition of the -7.7kb domain increased activity by about 30-fold (Fig. 2A). In order to determine whether the 862bp fragment has classical enhancer activity, we assessed its activity on its own and at various positions relative to the proximal promoter. Thus, the -7kb domain exhibited transcriptional activity when inserted upstream of a minimal promoter or of the proximal promoter, irrespective of its orientation; it was also active when inserted downstream of the reporter (Fig. 2B). The enhancer thus has classical enhancer properties and in order to assess its cell specificity, we assayed the activity of reporters in various cell lines. In cells of pituitary origin, the  $\alpha$ T3 gonadotrope cells, the enhancer had weak activity and it was almost devoid of transcriptional activity in heterologous cells (293T and Cos1) (Fig. S1A-D). We also tested whether the enhancer sequence may be hormone responsive in addition to exhibiting cell specificity: these experiments did not reveal any significant response of the enhancer to CRH, to the glucocorticoid dexamethasone (Dex), to the cytokine LIF or to combinations of these agents (Fig. 2C). While the cell specificity of the enhancer is consistent with the presence of Tpit at the -7kb enhancer in AtT-20 cells (Fig.1 C), its inability to respond to CRH, LIF and Dex is puzzling since the enhancer was also shown by ChIP to recruit Nurr1, Stat3 and GR. The enhancer's unresponsiveness to hormone stimulation was further supported by analysis of the reporter containing the entire -7.7kb region: this reporter responded to hormone stimulations in much the same way as the proximal -480bp promoter, and no more (Fig. 2C).



### **2.4.3. Enhancer activity is highly dependent on a palindromic Tpit binding site**

We focused first on the molecular basis for cell specificity of the -7kb enhancer. The *in silico* binding site predictions identified a putative palindromic Tbox response element (Fig. 3A). The putative TpitREpal is completely conserved in mice and humans and highly homologous to a consensus TbxRE. We mutated each half site individually and in combination in order to assess their importance for enhancer activity (Fig. 3A). When assessed together with the minimal POMC promoter, enhancer activity was severely reduced by mutagenesis of either half site and completely abrogated by their combined mutation (Fig. 3B). Similarly, the loss of enhancer activity was severe when the TpitREpal mutations were assessed in a reporter construct that contained the proximal promoter (Fig. 3C); in this context, the single and double mutants were as effective as each other and abolished enhancer activity. We have previously shown that Tpit requires Pitx1 to form heterodimers that bind and act on the Tpit/PitxRE of the proximal POMC promoter (8). We thus tested the effect of mutations introduced over either the Tpit or Pitx binding sites of the proximal promoter and their combination on the activity of the reporter that contains both promoter and enhancer (Fig. 3C). All three mutants had similar effects and decreased reporter activity by 2- to 3-fold. Combined mutations of the TpitREpal of the enhancer and of the Tpit/PitxRE of the promoter completely abolished activity of enhancer and promoter (Fig. 3C). Finally, we compared the activity of oligonucleotide reporters containing the TpitREpal from the POMC enhancer with similar oligonucleotides containing the consensus TbxRE and found both to be similarly active (Fig. 3D). In this isolated context, mutagenesis of each half site again had a dramatic effect on TpitREpal activity (Fig. 3D).

We then assessed Tpit's ability to activate enhancer reporters since the high degree of conservation between TbxRE and TpitREpal might be taken to suggest that any Tbox factor may account for the activity of the TpitREpal in AtT-20 cells. Co-transfection experiments were thus conducted in  $\alpha$ T3 cells, a model of pituitary gonadotrope cells that do not express Tpit. In this heterologous system, increasing doses of Tpit activate the

proximal POMC promoter up to about 3-fold whereas the enhancer construct was stimulated up to 6-fold by Tpit expression. Together, promoter and enhancer resulted in a synergistic activation of about 15-fold. Mutations of the TpitREpal half sites completely abrogated the ability to respond to Tpit (Fig. 4A). In further support of the importance of Tpit dimers for TpitRE activation, we used a natural TPIT mutant identified in isolated ACTH deficiency patients, Tpit M86R (23). Tpit M86R was previously shown to bind a TbxRE as monomer but it is not able to dimerize and form homodimers on this sequence or to dimerize with Pitx1 for binding to the Tpit/PitxRE of the promoter. The ability of Tpit M86R to activate either enhancer, promoter or enhancer+promoter constructs is severely curtailed (Fig. 4B, C) in agreement with a requirement on Tpit dimers for activation of the TpitRE. When we compared the ability of Tpit or Tpit M86R to activate the consensus TbxRE or TpitREpal reporters, it appeared that the TpitREpal of the POMC enhancer is more sensitive to the dimerization defect of Tpit M86R than the consensus TbxRE (Fig. 4D).

We next assessed the *in vitro* binding properties of wild-type and M86R Tpit on the TbxRE probe, and compared it to the TpitREpal of the POMC enhancer. We had previously shown that Tpit binds the TbxRE as monomer and homodimer (9) (Fig. 5, lanes 2,3). Similarly, we had shown that Tpit M86R only binds this probe as monomer (23) (Fig. 5, lanes 4, 5). Interestingly, the TpitREpal probe only revealed a single band with wild-type Tpit that co-migrates with the dimers observed with the TbxRE probe (Fig. 5, lane 7). This band is supershifted by the Tpit antibody (lane 8). And significantly, the TpitREpal probe is not bound in similar *in vitro* conditions by Tpit M86R (Fig. 5, lanes 9-10), in agreement with the greater sensitivity of this target sequence to the dimerization mutation in transfection assays (Fig. 4D). Finally, mutagenesis of either half site of the TpitREpal completely prevented *in vitro* binding of Tpit or Tpit M86R (Fig.5, lanes 12-15 and 17-20). In summary, the TpitREpal is highly dependent on Tpit dimers for binding and either mutagenesis of one half site or the Tpit M86R dimerization deficient mutant completely abolished its *in vitro* binding.

#### **2.4.4. The -7kb POMC enhancer exhibits preference for anterior pituitary corticotropes**

The *in vivo* properties of the -7kb enhancer were assessed by transient transgenesis in mice. For this purpose, we used LacZ reporter transgenes and assessed their activity at the cellular level in e17.5 founder mouse embryos. The -480bp POMC promoter was previously shown to direct expression only in the pituitary and in both corticotropes and melanotropes (11-15). In agreement with previous reports, we found significant penetrance of the promoter transgene in pituitary corticotropes and melanotropes (Fig. 6A) as assessed by co-labelling for Tpit and the  $\beta$ Gal marker from the transgene. A reporter containing the -7kb enhancer upstream of the minimal promoter was also expressed in pituitary and in no other tissue (Fig. 6A and data not shown), and within the pituitary expression of this transgene was limited to Tpit-positive cells. Similarly, a transgene containing both -7kb enhancer and proximal promoter exhibited corticotrope/melanotrope specificity (Fig. 6A). We and others have previously noticed that the -480bp POMC promoter has a slight preference for expression in intermediate lobe melanotropes compared to anterior lobe. In order to assess this preference and compare it to enhancer activity, we quantified the ratio of  $\beta$ Gal/Tpit-double positive cells over the total number of Tpit-positive cells in pituitaries of mice harbouring the three transgenes. This analysis (Fig. 6B) confirmed a preference of the -480bp promoter for IL melanotropes whereas the enhancer construct exhibited the reverse preference with a 2-fold more frequent co-expression with Tpit in the anterior relative to intermediate lobe. The transgene containing both had a somewhat intermediate preference for anterior corticotropes. These data indicated that the POMC enhancer and promoter have opposite preferences when assessed *in vivo* and together, they balance each other such that the resulting combined transgene shows little lineage preference. These data clearly support a role for both promoter and enhancer for *in vivo* expression of the POMC gene. Further support for the *in vivo* activity of the -7kb enhancer came from ChIP analyses of the Mediator complex protein Med12 at the POMC promoter and enhancer (Fig. 1C, E).

Indeed, a recent study has identified the Mediator complex and proteins of the cohesin family as critical components for bridging active enhancers with their corresponding promoter (24). The presence of Med12 at the -7kb enhancer is thus in support of the activity of this enhancer in AtT-20 cells. The activity of the -7kb enhancer is also supported by CHIP detection of p300 (25) at the enhancer (Fig. 1C).

#### **2.4.5. Species differences in POMC regulatory sequences**

The high degree of conservation of the TpitREpal in human and mouse POMC enhancers contrasts with the weaker conservation of the Tpit binding motif in the human Tpit/PitxRE (Fig. 7A and S2). In fact, the putative human Tpit binding site of the promoter Tpit/PitxRE is so poorly conserved that is not recognized by any *in silico* algorithm and one may be justified to challenge the importance of Tpit for activity of the human promoter. In order to assess the relative importance of the human promoter and enhancer compared to rodents, we made similar luciferase reporters containing the human promoter and/or enhancer. The activity of these reporters was assessed by transfection in AtT-20 cells and compared with the rodent sequences that were previously characterized. This analysis revealed that both human enhancer and promoter are active and exhibit synergism (much like the rodent regulatory sequences) but they are less active when assessed in the mouse AtT-20 cells (Fig. 7B). The species differences between the cognate transcription factors may account for the lesser activity of human sequences. Complementation of Tpit activity in  $\alpha$ T3 cells stimulated both human promoter and enhancer (Fig. 7C). The data thus support action of Tpit on the human Tpit/PitxRE despite its poor conservation. A direct assessment of the Tpit/PitxRE potency was carried out using reporters containing three copies of Tpit/PitxRE from rat, mouse and human. This analysis (Fig. 7D) showed that all three are responsive to Tpit but that their relative activities correlate well with sequence conservation of the Tpit binding site by comparison to a canonical Tbox factor binding site.

The *in silico* analyses of the human orthologous enhancer region revealed predicted TFBS (Fig. 7E) that are similar to those that were predicted and found to recruit cognate factors in the mouse (Fig. 1B). Surprisingly and in contrast to the mouse enhancer (Fig. 2C), the human enhancer reporter was found to be responsive to CRH but not to LIF (Fig. 7F). Whereas the enhancer is not responsive to Dex alone, Dex significantly repressed CRH-stimulated activity. It is striking that the human enhancer is predicted to have very good Stat3 binding sites as well as multiple NBRE sequences, but no GRE (Fig. 7E). As for the mouse enhancer, it thus appears that the presence of either *in silico* predicted site or occupancy as revealed by ChIP are not good predictors of the activity of the enhancer regulatory sequences since the mouse enhancer was found to be unresponsive to hormones despite the presence of appropriate binding sites and the human enhancer responded to CRH and Dex but not to LIF despite the presence of *bona fide* Stat3 sites. Collectively, these data suggest that protein:protein interactions and protein context at regulatory sequences are critical to determine the potency of specific transcription factors to modulate transcription. These data suggest that POMC promoter and enhancer may play different roles depending on the species.

In order to evaluate variation in these sequence motifs in evolution, we examined UCSC multi-species comparisons of POMC locus (Fig. S3A). Interestingly this comparison reveals conservation of the POMC enhancer (Fig. S3B) across mammals, with some exceptions like guinea pig, chimp, orang-utan and cat. This uneven conservation contrasts with the more global conservation of the hypothalamic enhancers nPE1 and nPE2 and the promoter (Fig. S3A, C).

## 2.5. Discussion

The quest to identify relevant regulatory sequences has been ongoing since the advent of gene regulation studies and it is still a challenge. Very recent genomic studies have identified markers of chromatin structure that appear to present the most hopeful and generally applicable approach to this quest but it is still a relatively challenging trial-and-error endeavour. It is now clear that most mammalian genes have multiple regulatory enhancers that may be very distant from protein-coding sequences. Further, these regulatory modules/enhancers are used in different combinations to target cell-specific expression of genes that are expressed in multiple cells or tissues. In the present work, we have queried the relevance of sequences located about 7kb upstream of the POMC gene transcription start site because of the identification through chromatin immunoprecipitation of different transcription factors in this region, initially Stat3 followed by many other factors known to be critical for the corticotrope-specific program of gene expression. The -7kb enhancer is highly conserved among mammalian species but that in itself is not always a sufficient criterion to discriminate relevant regulatory sequences. The presence of general co-activators such as p300 at most active enhancers is a good predictor of regulatory sequences (25;26). Further, the recently observed link provided between active tissue-specific enhancers and promoters by the Mediator complex and cohesins (24) provides the most powerful tool to identify enhancers that are active in a cell-specific context. Hence, demonstration of strong recruitment of p300 and of the Mediator protein Med12 at the POMC -7kb enhancer is a strong argument to suggest that this enhancer is active in AtT-20 cells. In this context, it is noteworthy that Stat3 or any of the other proteins that we have assessed, is not present at two other upstream enhancers of the POMC locus, namely the nPE1 and nPE2 elements that have been otherwise associated with neuronal expression of POMC (16). The chromatin marks studied in the present work are therefore consistent with activity of the -7kb enhancer in AtT-20 cells (and in pituitary) whereas the upstream nPE1 and nPE2 appear irrelevant for pituitary expression, in contrast to their importance for driving POMC expression in the hypothalamus and arcuate nucleus.

The activity of the -7kb enhancer is highly dependent on the palindromic TpitREpal (Fig. 3, 4). The TpitREpal is the first reported example of a natural palindromic response element for transcription factors of the Tbox family. Indeed, the consensus TbxRE palindromic element was defined by *in vitro* analyses (27;28) but no sequences of this type were yet reported in natural regulatory sequences. It is noteworthy that the central peak of conservation (Fig. 1A and S3B) observed within the -7kb enhancer is centered around the TpitREpal. The TpitREpal is thus at the core of the conserved sequences and interestingly, it is activated by dimers of Tpit, a most highly cell-restricted transcription factor since it is only expressed in the two pituitary POMC lineages (8). The importance of the TpitREpal for POMC expression is consistent with the identification of numerous Tpit mutations in children with congenital early onset isolated ACTH deficiency (IAD). We have previously shown that many of these Tpit mutant proteins are deficient in DNA binding and most interestingly, we identified one mutation that blocks dimerization of Tpit, the M86R mutation (23). In agreement with the ACTH deficiency caused by this mutation, the Tpit M86R mutant protein fails to homodimerize and to efficiently activate reporters containing the TpitREpal. By comparison to the Tpit/PitxRE of the promoter, the TpitREpal of the -7kb enhancer may thus be regarded as the most specific target of the highly cell-restricted transcription factor Tpit, particularly in the human gene where the promoter Tpit/PitxRE is less conserved (Fig. 7A, D). The cell-specific activity of the enhancer *in vivo* is thus not surprising and consistent with a unique role of the -7kb in ensuring pituitary cell-specific expression of POMC.

The -7kb regulatory sequences exhibit all the hallmarks of enhancers, namely their activity at a distance from the promoter, incl. downstream of the reporter gene and in either orientation (Fig. 2). The mouse -7kb enhancer does not appear to contribute to hormone responsiveness, despite the identification by CHIP of CRH-activated Nurr1, LIF-activated Stat3 and Dex-dependent GR (Fig. 1C). Thus, a contribution of the enhancer for hormonal regulation of POMC transcription may not be essential since the -480bp promoter recapitulates responsiveness to CRH, LIF and Gc by comparison to regulation of the

endogenous POMC gene. This issue is further confounded by the fact that the human -7kb enhancer does exhibit responsiveness to CRH and Dex but not to LIF (Fig. 7E). Since both -7kb enhancer and promoter are conserved in many species, it is possible that many regulatory motifs are conserved within these regulatory modules across species but they are not used in all species.

It is noteworthy that the -7kb enhancer harbours putative binding sites for all but one critical transcription factors of the POMC promoter and that in all cases, the putative activity of these binding sites is supported by ChIP data (Fig. 1). The only exception is Pitx1 that is critical for promoter activity and in particular, activity of the Tpit/PitxRE that represents the corner stone of cell specificity of the promoter (8;29). Interestingly, the poor conservation of the Tpit binding site in the human and mouse Tpit/PitxRE compared to rat is correlated with their intrinsic activity (Fig. 7D) but not so directly with promoter activity (Fig. 2B and 7B) or with promoter/enhancer occupancy by Tpit (Fig. 1C, E). Since enhancer activity is so critically dependent on the highly cell-restricted Tpit (Fig. 3), it is possible that it serves a lineage-restricted amplification role whereas the POMC promoter that also depends on Pitx1 may have a more important role in initial activation of the locus since Pitx1 is expressed before pituitary organogenesis. Be that as it may, both promoter and enhancer exhibit highly pituitary-specific activity in transgenic mouse assays without detectable expression in any other tissue including the hypothalamus where expression appears to be driven by the nPE1 and nPE2 enhancers that lie further upstream. At this point, it is not clear what may be the molecular basis for the preferential activity of the -7kb enhancer in AL corticotropes compared to the promoter preference for IL melanotropes. In all likelihood, both promoter and -7kb enhancer participate in activity of the POMC gene in both cell types.

The elegant studies of David Stern in drosophila (1) have recently exemplified the frequent redundancy of regulatory modules for construction of various tissue-specific gene expression patterns. We may speculate that the relative importance of enhancer relative to



promoter may differ between species, such as in men and mice, but such conclusion would require analyses in homologous systems.

## 2.6. Materials and methods

### 2.6.1. Cell culture and transfection

AtT-20,  $\alpha$ T3, 293T and Cos1 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The cells were plated in 12-well plates and transfected with 500 ng of luciferase reporter construct using Lipofectamine reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The second day after transfection, cells were stimulated for 4h with either PBS as vehicle, CRH  $10^{-7}$  M, dexamethasone (Dex)  $10^{-7}$  M (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and/or LIF 10 ng/ml (Chemicon, Billerica, MA), as indicated. To assess Tpit-responsiveness, we co-transfected 500ng of luciferase reporters with increasing concentration (0-250ng) of WT and M86R mutant Tpit effector plasmid (23) and empty pSP64 plasmid to make up the total amount.

### 2.6.2. Reporter constructs

The previously described (29) minimal (-34/+63bp) and proximal (-480/+63bp) POMC promoter luciferase reporter constructs were used as starting point for enhancer constructs. The enhancer region (832bp PCR amplified fragment) was inserted upstream the minimal promoter and in different location and orientation in the proximal promoter reporter. The 6.9kb and 7.7kb POMC locus constructs were created by insertion of two Pfu Turbo amplified fragments into the previous reporter plasmid after complete removal of the proximal POMC promoter. The TpitREpal mutants were generated according to QuickChange site-directed mutagenesis protocol (Stratagene, La Jolla, CA), whereas the Tpit/PitxRE mutant were previously described (8). Consensus TbxRE and TpitREpal oligonucleotides were inserted upstream the minimal POMC promoter to assess the importance of Tpit homodimer binding. Oligonucleotides used for cloning are: TbxRE GATCCAATTCACACCTAGGTGTGAAATTG), TpitREpal (GATCCGTA CTACACCCTGGTGACATCTCG / GATCCGAGATGTCACCAGGGTGTGAGTACG), TpitREpal 1<sup>st</sup> mutant and 2<sup>nd</sup> mutant

used the same oligos as TpitREpal with the appropriate modifications. The rat, mouse and human Tpit/PitxRE constructs were created using similar oligonucleotides that encompass their respective Tpit/Pitx binding site. Cohesive double-stranded oligonucleotides were inserted in the same orientation as trimers upstream of the minimal POMC promoter to evaluate the effect of sequence divergence at the Tpit binding site on activity. We used the following oligonucleotides to create the constructs: rat (GATCCTGCCTCACACCAGGATGCTAAGCCTCTGTCCAGTA / GATCTACTGGACAGAGGCTTAGCATCCTGGTGTGAGGCAG), mouse (GATCCTGCCTCGCACAGGGACGCTAAGCCTCTGTCCAGTA / GATCTACTGGACAGAGGCTTAGCGTCCCTGTGCGAGGCAG) and human (GATCCTGCCCCACACGGGGGTGCTAAGCCTCCCGCCCGTA / GATCTACGGGCGGGAGGCTTAGCACCCCCGTGTGGGGCAG). Human promoter and enhancer reporter constructs were designed with sequences corresponding to the mouse reporters. All reporter constructs were sequenced to ensure accuracy of DNA sequences.

### 2.6.3. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and QPCR

AtT-20 cells were grown to 60-70% confluence and stimulated with 10 ng/ml LIF, CRH  $10^{-7}$  M or Dex  $10^{-7}$  M for 20 min when required. ChIP were performed as described previously (30), with little modifications. Briefly, chromatin was crosslinked with 1% formaldehyde added directly to the culture medium (5 min at room temperature). Crosslinking was stopped with glycine 125 mM in PBS for 5 min. Nuclei were prepared by sequential incubation and purification by centrifugation on ice for 5 min in buffer A (10 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 0.25% Triton X-100), and for 30 min in buffer B (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) (all buffers include protease inhibitors). Nuclei were resuspended in sonication buffer (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100, 0.05% NaDOC, 140 mM NaCl) and sonicated to obtain chromatin fragments of an average length of 500 bp. Sonicated chromatin was immunoprecipitated with either rabbit IgG (G2018, Sigma-Aldrich), GR (sc-1004), a

combination of phospho-Stat3 (sc-7993) and Stat3 (sc-482x) antibodies, RNA Pol II (sc-899), Nurr1 (sc-991x), p300 (sc-585x) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Med12 (A300-774A, Bethyl, Montgomery, TX) or homemade Pitx1 (31), NeuroD1 (12) and Tpit (8) antibodies. The immunoprecipitate was collected using protein-A/G beads (Santa Cruz Biotechnology). After washes and decrosslinking, DNA was purified using QIAquick columns following manufacturer's directives (Qiagen, Mississauga, On). Enrichment was assed by QPCR with Perfecta SYBR green PCR kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). The oligonucleotides used for QPCR are: POMC promoter (TGGTTTCACAAGATATCACACTTTCCC / TCGGAGTGGAATTACCTATGTGCG) POMC enhancer (TTCCCATGCAGGTCACAAGACTCA / AAGGCAGAGGGTGAAGGAAGAAA) and MyoD as control (TGCTCCTTTGAGACAGCAGA / TTTCAGGAGGGCTCCCATGT).

#### 2.6.4. Binding motif analyses

The mouse and human POMC enhancer sequences were challenged against all known transcription factor binding motifs using the MatInspector software (Genomatix).

#### 2.6.5. Electromobility shift assay

The gel retardation assay was performed as previously described (23). The retardation assay with the consensus TbxRE palindrome (GATCCAATTTACACCTAGGTGTGAAATT), TpitREpal (GATCCGTACTIONCACACCCTGGTGACATCTC; GATCCGAGATGTCACCAGGGTGTGAGTAC), TpitREpal 1<sup>st</sup> mutant (GATCCGTACTIONCACCAACTGGTGACATCTC; GATCCGAGATGTCACCAGTTGGTGAGTAC) and TpitREpal 2<sup>nd</sup> mutant (GATCCGTACTIONCACACCCTTTGGACATCTC; GATCCGAGATGTCCAAAGGGTGTGAGTAC) was performed using 5µl of *in vitro*

transcribed mouse WT and M86R Tpit proteins produced with the rabbit reticulocyte lysate system following the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI). The proteins were incubated for 1h on ice with 50,000 CPM of <sup>32</sup>P-dATP labelled probes of similar specific activity in presence of 1 µg of salmon sperm DNA. Homemade rabbit anti-Tpit antibody was added 20 min prior loading for the supershifted experiments.

#### **2.6.6. Transgenic mice**

We inserted the POMC promoter and -7kb enhancer region into pWHERE plasmid (InvivoGen, San Diego, Ca). This reporter was modified to excise the injected fragments with NotI restriction enzyme. The transgenes containing a LacZ reporter gene with a nuclear localization signal, were injected into B6C3 fertilized eggs. Mouse embryos (e17.5) were genotyped by PCR with the following oligonucleotides: AATGCTGTTCTGCAGACCTCTCT / GCGCTGGTGGTTAGGAAGAACTTA for the promoter construct, and TTCCCATGCAGGTCACAAGACTCA / CAGTCTCTCCTTTGCAGCACAACA for the -7kb enhancer constructs.

#### **2.6.7. Immunofluorescence and cell counts**

Paraffin-embedded formalin-fixed transgenic embryonic tissue sections were analyzed by co-immunofluorescence with rabbit anti-Tpit and goat βGal (56028, MP Biomedicals, Solon, OH); Hoechst was used for nuclear staining. Complete embryo sections were analyzed for each transgenics and Tpit and/or βGal expression was found to be restricted to the pituitary POMC-expressing cells. The number of βGal expressing Tpit-positive cells as well as the total number of Tpit cells was determined for anterior (AL) and intermediate (IL) pituitary lobe separately. To evaluate the relative tissue penetrance of the different transgenes, the AL/IL ratio was then calculated on the proportion Tpit cells expressing β-Gal reporter gene.

## **2.7. Footnotes**

### ***Acknowledgements***

We are grateful to Lise Laroche for her expert secretarial assistance.

### ***Funding***

Guillaume Sylvain-Drolet was supported by a COPSE scholarship. The work of David Langlais was supported by a fellowship from Université de Montréal. The work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to J.D.

### ***Disclosure statement***

The authors have nothing to disclose.

## 2.8. References

1. Frankel N, Davis GK, Vargas D, Wang S, Payre F, Stern DL 2010 Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* 466:490-493
2. Drouin J 2010 Pituitary Development. In: Melmed S (ed) *The Pituitary* 3rd Edition. Elsevier-Academic Press, Publishers, 3-19
3. Tremblay JJ, Lanctôt C, Drouin J 1998 The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* 12:428-441
4. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-333
5. Camper SA, Saunders TL, Katz RW, Reeves RH 1990 The Pit-1 Transcription Factor Gene Is A Candidate for the Murine Snell Dwarf Mutation. *Genomics* 8:586-590
6. Li S, Crenshaw EBI, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG 1990 Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347:528-533
7. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG 2007 Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87:933-963
8. 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
9. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Tsai JPY, Couture C, Gauthier Y, Drouin J 2003 Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* 17:738-747
10. Proulx-Ferland L, Meunier H, Côté J, Dumont D, Gagné B, Labrie F 1983 Multiple factors involved in the control of ACTH and  $\alpha$ -MSH secretion. *J steroid Biochem* 19:439-445

11. Tremblay Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, Drouin J 1988 Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8890-8894
12. Lavoie PL, Budry L, Balsalobre A, Drouin J 2008 Developmental Dependence on NurRE and EboxNeuro for Expression of Pituitary POMC. *Mol Endocrinol* 22:1647-1657
13. Hammer GD, Fairchild-Huntress V, Low MJ 1990 Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:1689-1697
14. Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ 1992 Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary gland of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:3978-3990
15. Rubinstein M, Mortrud M, Liu B, Low MJ 1993 Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocrinol* 58:373-380
16. de Souza FS, Santangelo AM, Bumashny V, Avale ME, Smart JL, Low MJ, Rubinstein M 2005 Identification of neuronal enhancers of the proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting. *Mol Cell Biol* 25:3076-3086
17. Young JI, Otero V, Cerdan MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, Rubinstein M 1998 Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of proopiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 18:6631-6640
18. Langlais D, Couture C, Balsalobre A, Drouin J 2008 Regulatory network analyses reveal genome-wide potentiation of LIF signaling by glucocorticoids and define an innate cell defense response. *PLoS Genet* 4:1-14
19. Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S 2000 Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immunoneuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106:1417-1425



20. Mynard V, Guignat L, Devin-Leclerc J, Bertagna X, Catelli MG 2002 Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology* 143:3916-3924
21. Jeannotte L, Trifiro MA, Plante RK, Chamberland M, Drouin J 1987 Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol Cell Biol* 7:4058-4064
22. Therrien M, Drouin J 1991 Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492-3503
23. Vallette-Kasic S, Couture C, Balsalobre A, Gauthier Y, Metherell LA, Dattani M, Drouin J 2007 The TPIT gene mutation M86R associated with isolated ACTH deficiency interferes in protein:protein interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3991-3999
24. Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J, Young RA 2010 Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* doi:10.1038/1-6
25. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenko VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B 2009 Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459:108-112
26. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B 2007 Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39:311-318
27. Kispert A, Herrmann BG 1993 The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 12:4898-4899
28. Muller CW, Herrmann BG 1997 Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* 389:884-888

29. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J 1996 PTX1, a bicoid-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* 10:1284-1295
30. 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
31. Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J 1999 Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140:1416-1422
32. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D 2002 The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996-1006
33. Blanchette M, Tompa M 2002 Discovery of regulatory elements by a computational method for phylogenetic footprinting. *Genome Res* 12:739-748

## 2.9 Figure Legends

### Figure 2.1. Identification of a novel POMC regulatory region.

**A)** Whole-genome Stat3 ChIP-chip analyses in AtT-20 (18) cells reveal recruitment of Stat3 at the POMC promoter and in a region located about 7kb upstream (green boxes, top diagram). Blue boxes and lines represent the POMC gene exons and introns, respectively. The “mammalian conservation” diagram represents sequence conservation around the POMC locus derived from 19 available mammalian species using mm9 assembly on the UCSC genome browser (32;33). The position of previously identified hypothalamic regulatory elements nPE1 and nPE2 (16) as well as that of the promoter and -7kb enhancer are indicated by black boxes. **B)** Schematic representation of the -7kb enhancer indicating putative regulatory elements and transcription factor binding sites as identified by *in silico* analyses with MatInspector software (Genomatix) **C)** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses of the -7kb POMC enhancer for recruitment of the indicated transcription factors. ChIP experiments performed in AtT-20 cells used hormone-stimulated cells for Nurr1 (+CRH), Stat3 (+LIF) and GR (+Dex). ChIP enrichments are normalized relative to a control IgG ChIP and an unbound control region of the MyoD gene. Data are representative of at least three independent experiments. #Pitx1 ChIP is the only one to exhibit no significant recruitment. **D)** Schematic representation of the POMC promoter indicating the position of known regulatory elements. **E)** ChIP analyses of transcription factor recruitment to the POMC promoter in the same experiment as presented for the enhancer in C). All recruitments are significant compared to IgG control.

### Figure 2.2. The -7kb POMC conserved region has enhancer properties.

**A)** Activities of luciferase reporter constructs containing either 6.9 or 7.7 kb upstream 5' flanking sequences upon transfection in AtT-20 cells. **B)** Activity (relative to minimal promoter construct) of various luciferase reporters upon transfection of AtT-20 cells. The light grey box represents the -480/-34 bp proximal promoter while the darker grey box represents the enhancer located at -7kb in the POMC locus. **C)** Hormone response of POMC luciferase reporters containing either minimal (-34/+63 bp) promoter, -7kb

enhancer, -480bp proximal promoter or -7.7 kb 5' flanking sequences. Activation is relative to non-treated cells (Ctl). All data represent the means ( $\pm$  s.e.m.) of independent experiments [n=3 (A), 7 (B) and 4 (C)] each performed in duplicates.

**Figure 2.3. Enhancer activity is dependent on palindromic Tpit binding site (TpitREpal).**

**A)** DNA sequence of the mouse and human TpitREpal elements of the -7kb enhancer compared to a consensus TbxRE. The nucleotide changes used to create mutations in each or both half sites of the TpitREpal are indicated. **B)** Activity of enhancer reporters upon transfection into AtT-20 cells. The X over the TpitRE boxes indicates mutagenesis of either or both half sites. **C)** Activity of various reporters upon transfection in AtT-20 cells. The X in the reporter diagram indicates the element(s) that have been mutated in either enhancer and/or promoter. **D)** Activity of oligonucleotide luciferase reporters upon transfection into AtT-20 cells. The reporters contain either consensus TbxRE or TpitREpal oligonucleotides or their mutants as indicated. All data represent the means ( $\pm$  s.e.m.) of independent experiments [n=5 (B), 3 (C) and 3 (D)] each performed in duplicates.

**Figure 2.4. Activation of luciferase reporter constructs by Tpit in Tpit-deficient mouse  $\alpha$ T3 cells.**

**A)** Tpit dose-response curves for activation of POMC luciferase reporters represented schematically on left. **B)** Effect of wild-type or dimerization-deficient M86R Tpit (0,5 or 250 ng of expression vectors) on activity of indicated reporters. **C)** Dose-responses to Tpit and Tpit M86R of -7.7kb at -6.9kb POMC promoter reporters. **D)** Responsiveness of oligonucleotide reporters to either Tpit or Tpit M86R. All data are presented as means ( $\pm$  s.e.m.) of at least three independent experiments, each performed in duplicates.

**Figure 2.5. Tpit dimers bind the TpitREpal *in vitro*.**

**A)** Gel retardation was used to assess binding of either wild-type (WT) Tpit or mutant M86R to the consensus TbxRE palindrome and to TpitREpal probes, or to probes mutated

for each half-site of the TpitREpal, as indicated. Equivalent amounts of  $^{32}\text{P}$ -labelled probes were used. The first panel is an overnight film exposure, whereas the last three panels are 3 days exposures of the same gel. Tpit binding to the consensus TbxRE probe is stronger than the TpitREpal (compare lanes 2 and 7) but Tpit:DNA complexes are supershifted by Tpit antibody in both cases (lanes 3 and 8). The M86R Tpit dimerization-mutant exhibit monomeric binding on the consensus TbxRE, contrasting with an absence of TpitREpal probe retardation (lanes 4 and 9). Mutant probes for either half-site of the TpitREpal do not exhibit any binding (lanes 11-20).

**Figure 2.6. Preferential activity of -7kb enhancer transgene in corticotropes compared to promoter bias towards melanotropes.**

**A)** The different LacZ transgene reporters used to assess activities of POMC promoter, enhancer or both together, are represented schematically at the top together with the number of transgenic e17.5 pups that express the transgene over the total number of transgenic pups analyzed. Co-immunofluorescence for Tpit (green) and  $\beta\text{Gal}$  transgene (red) is shown for three different pituitaries harbouring each of the three transgenes analyzed. Insets show magnifications of co-localization in anterior lobe. **B)** Quantitation of  $\beta\text{Gal}$  transgene reporter expression in AL corticotropes relative to IL melanotropes. The expression of  $\beta\text{Gal}$  transgenes was scored over the total number of Tpit-positive cells in AL and IL separately, and their ratio is presented for each transgene. For each expressing transgenic embryo, at least four pituitary sections were scored. Pairwise p values were calculated using T-test for the enhancer constructs relative to the -480bp promoter construct. Whereas the -480bp promoter exhibits a preference for IL melanotrope expression, both reporters containing the enhancer exhibit preference for AL corticotropes.

**Figure 2.7. Properties of human -7kb POMC enhancer.**

**A)** Sequence comparison of conserved Tpit regulatory elements of the promoter and -7kb enhancer. The TpitREpal of the -7kb enhancer is more conserved across species than the Tpit/PitxRE of the promoter. TpitRE sequences are shown in blue and PitxRE in red. **B)** Activity of luciferase reporters containing either human (Hs) POMC promoter, -7kb

enhancer or both upon lipofection into AtT-20 cells. Results are the means  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments each performed in duplicates. **C)** Activation of indicated luciferase reporters by increasing amounts of Tpit expression vector upon lipofection into  $\alpha$ T3 cells. A representative of two independent experiments is shown. **D)** Activation of rat, mouse and human Tpit/PitxRE reporters by indicated amounts of Tpit expression plasmid following lipofection in  $\alpha$ T3 cells. Conserved nucleotides within the Tpit binding site are indicated by capital letters. **E)** Schematic representation of the human -7kb enhancer indicating the position of predicted regulatory elements/transcription factor binding sites as identified by *in silico* analyses with MatInspector software (Genomatix). **F)** Hormone response of the indicated luciferase reporters upon lipofection into AtT-20 cells. Representative data of four independent experiments, each performed in duplicates ( $\pm$  s.e.m.).

**Figure 2.S1. Activity of the POMC promoter and/or -7kb enhancer upon lipofection into the indicated cell lines.**

A) Activity in the mouse corticotrope model cells AtT-20. B) Activity in the mouse gonadotrope model cells  $\alpha$ T3. C) Activity in human fibroblasts 293T. D) Activity in monkey kidney Cos1 cells.

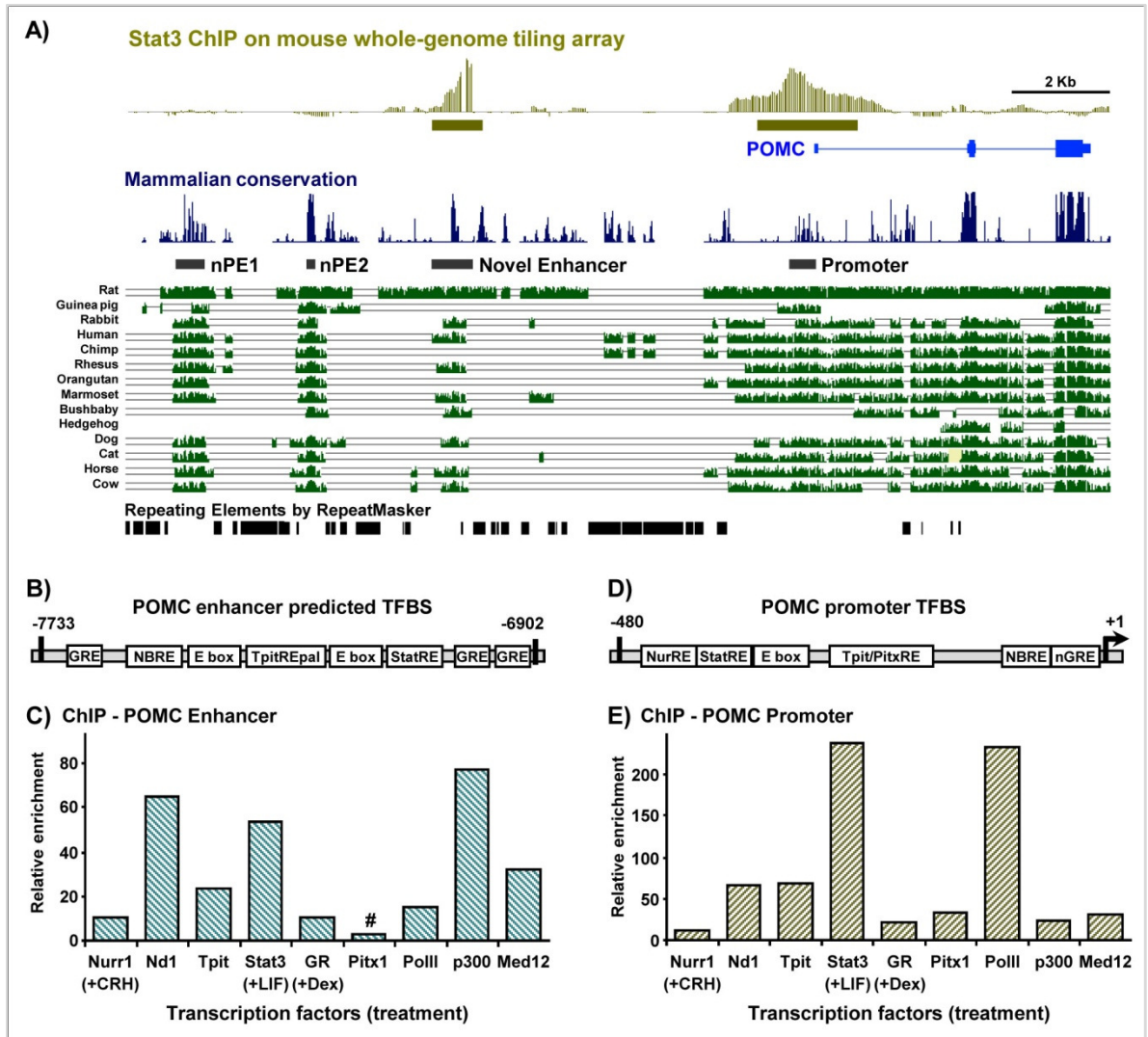
**Figure 2.S2. Sequence alignments for POMC -7kb enhancer TpitREpal and promoter Tpit/PitxRE.**

Tpit binding motifs are shown in blue whereas Pitx binding sites are shown in red.

**Figure 2.S3. Extended comparison of sequence conservation in species for which DNA sequences of the POMC locus is available.**

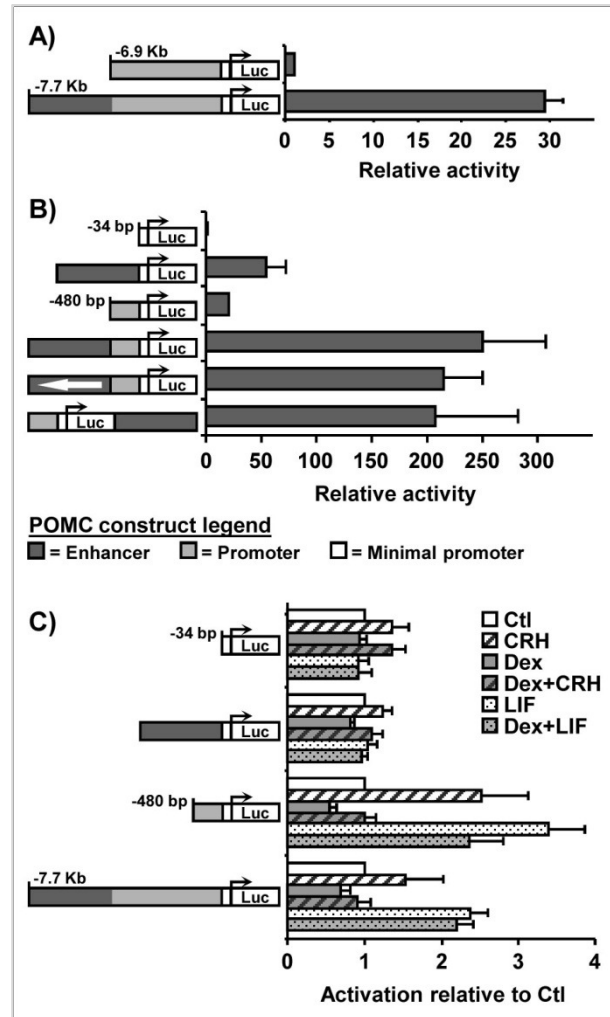
A) UCSC genome browser snapshot of the POMC locus from the mm9 genome assembly (1;2). The top black boxes represent regulatory regions such as nPE1, nPE2, the novel -7kb pituitary enhancer and promoter. The POMC gene is schematized by blue boxes and lines representing exons and introns, respectively. The blue graph represents the mammalian

sequence conservation across the POMC locus, followed by the alignment of 27 available vertebrate genome sequences (in green). Repeated elements are annotated at the bottom. B) Sequence conservation analysis of the -7kb enhancer. C) UCSC genome browser zoom of the -480/+34 bp (rat coordinates) promoter using the same presentation as in the previous panel.

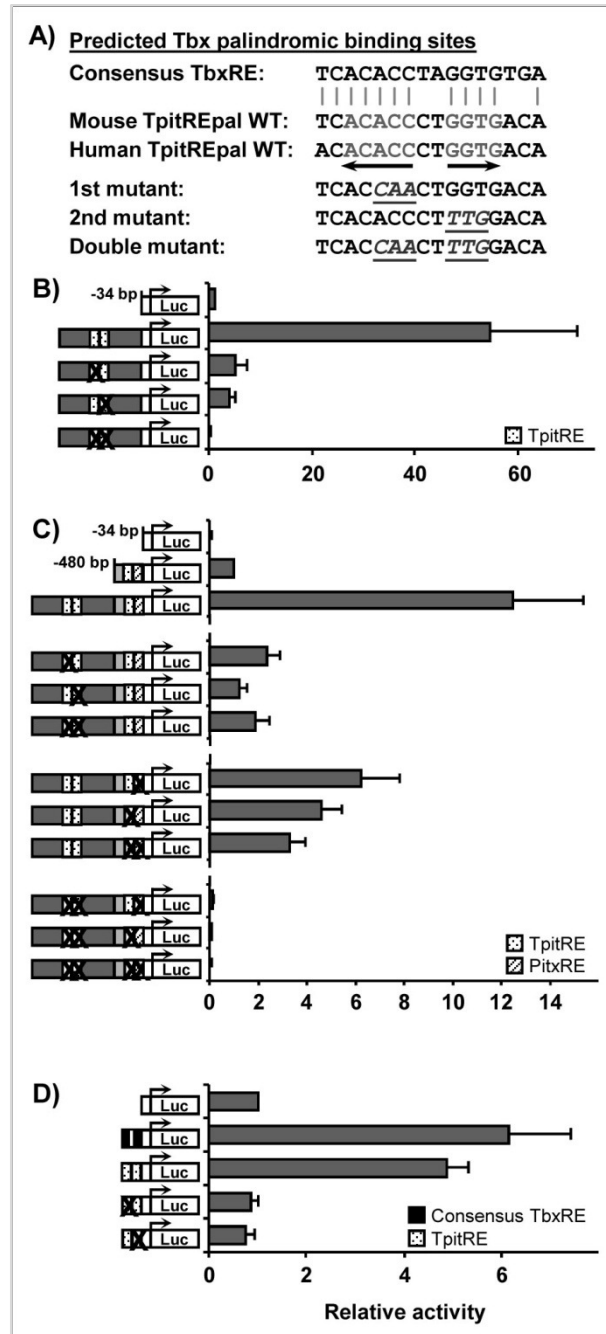


**Figure 2.1. Identification of a novel POMC regulatory region.**

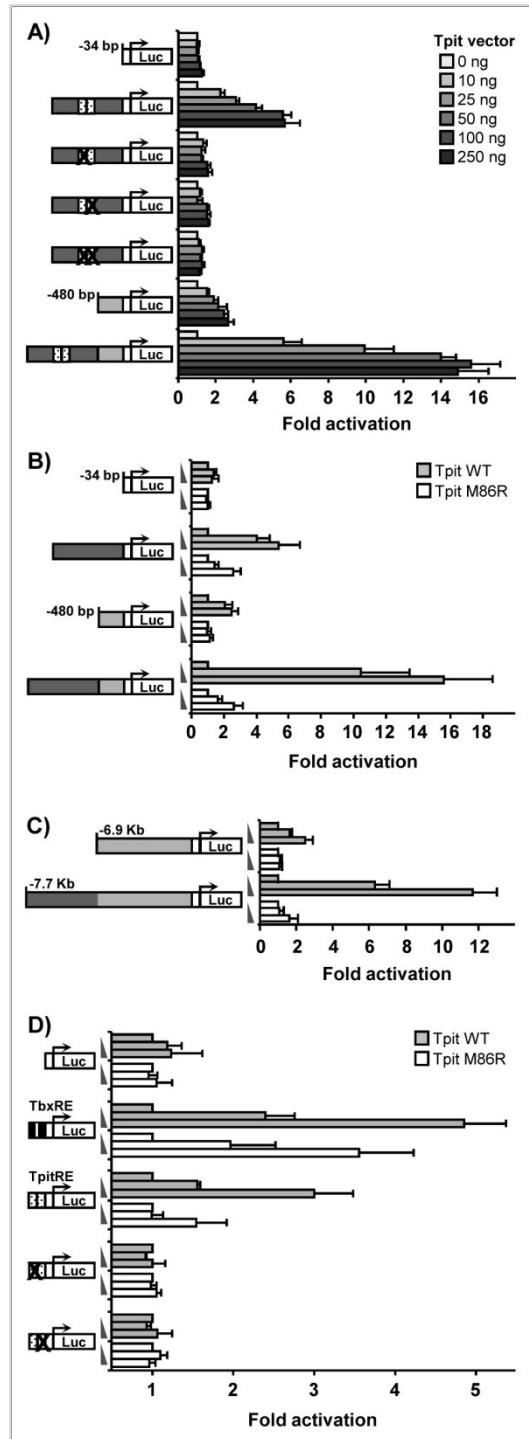




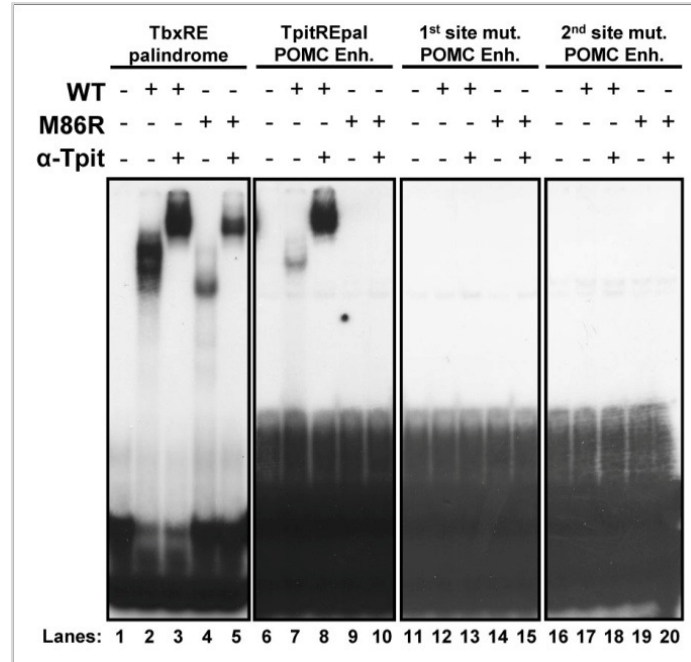
**Figure 2.2. The -7kb POMC conserved region has enhancer properties.**



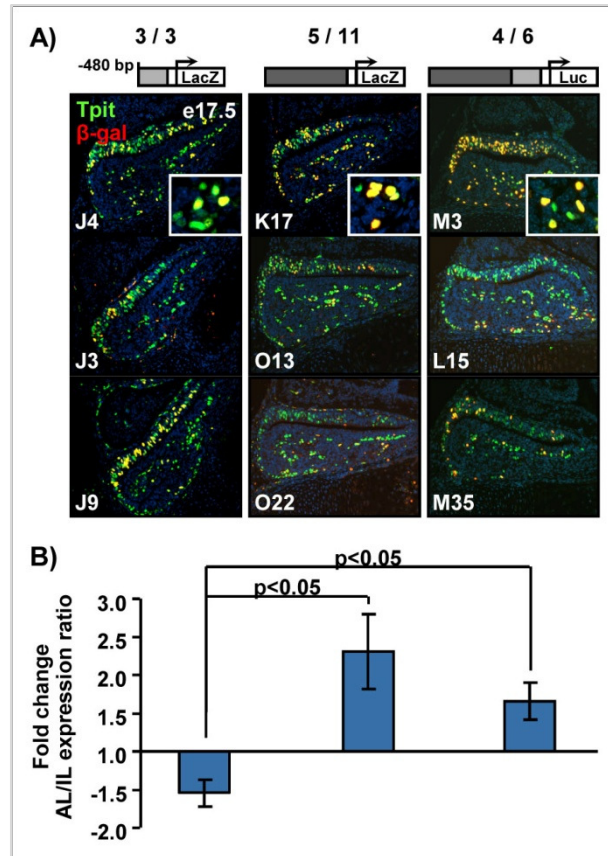
**Figure 2.3. Enhancer activity is dependent on palindromic Tpit binding site (TpitREpal).**



**Figure 2.4. Activation of luciferase reporter constructs by Tpit in Tpit-deficient mouse  $\alpha$ T3 cells.**



**Figure 2.5.** Tpit dimers bind the TpitREpal *in vitro*.



**Figure 2.6. Preferential activity of -7kb enhancer transgene in corticotropes compared to promoter bias towards melanotropes.**

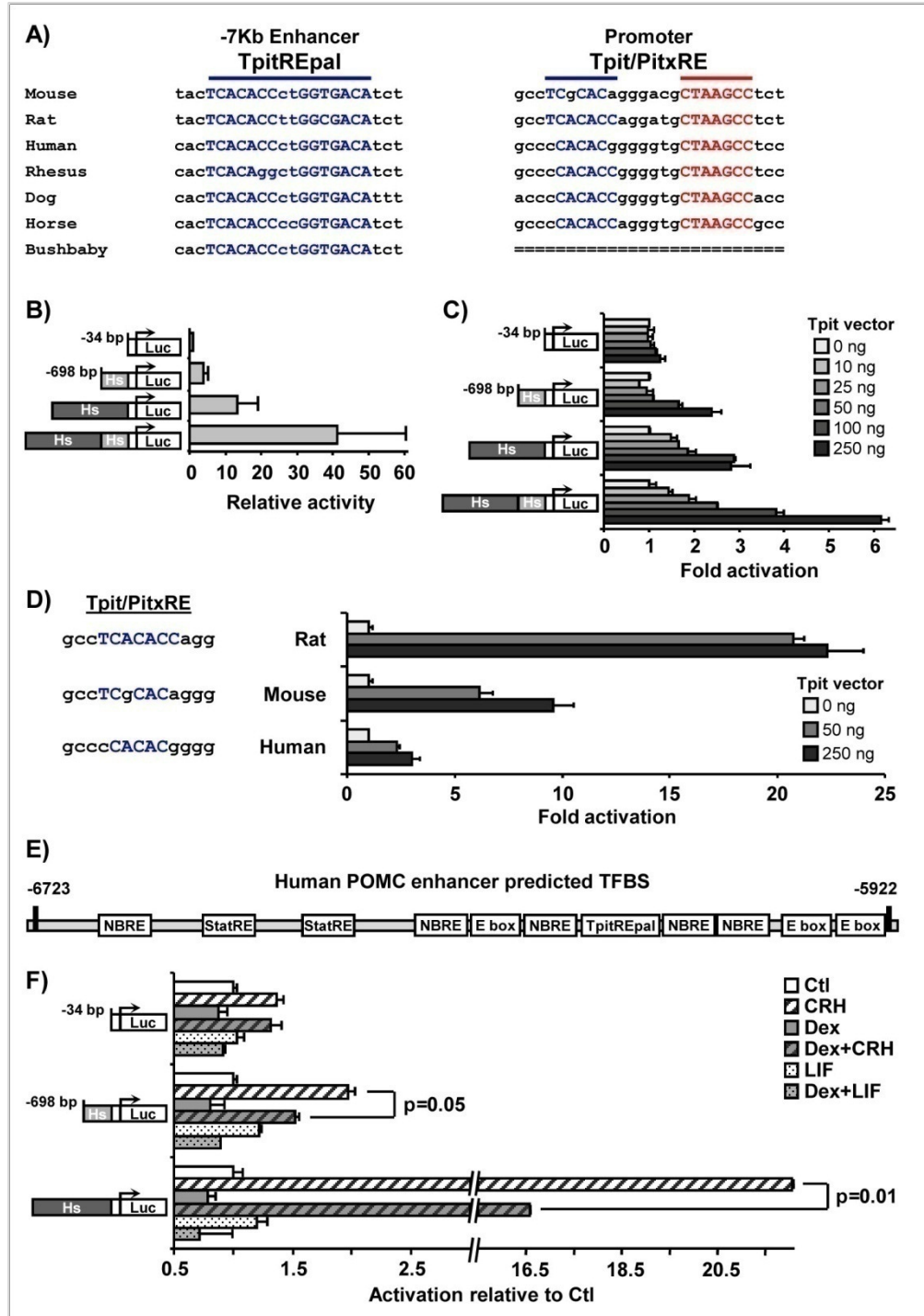


Figure 2.7. Properties of human -7kb POMC enhancer.

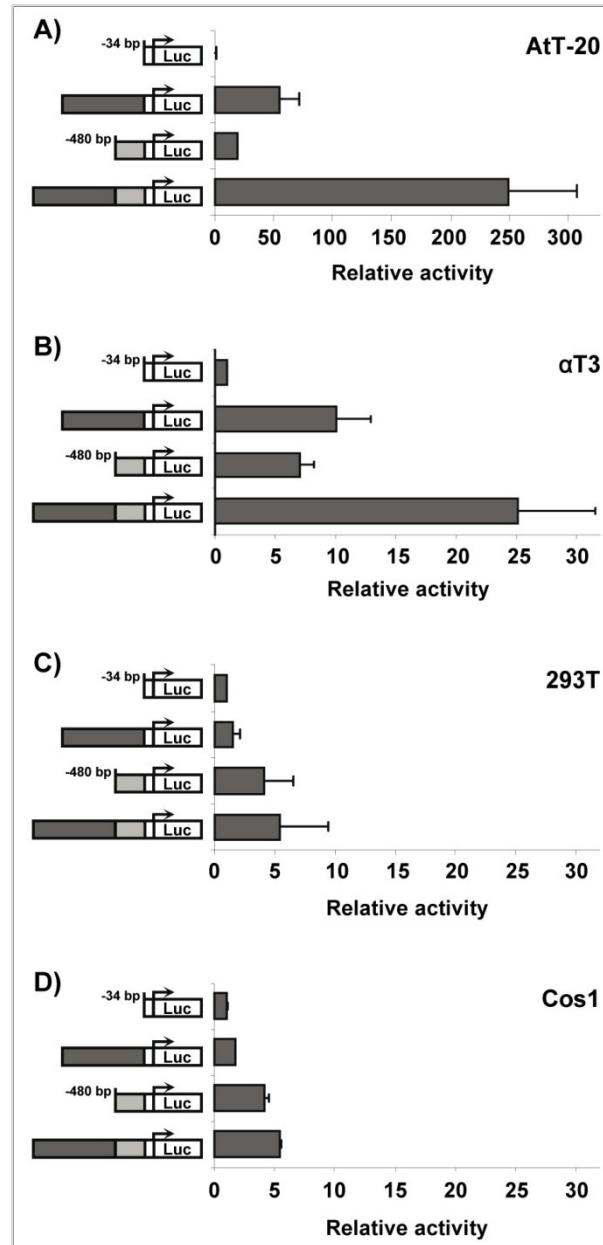
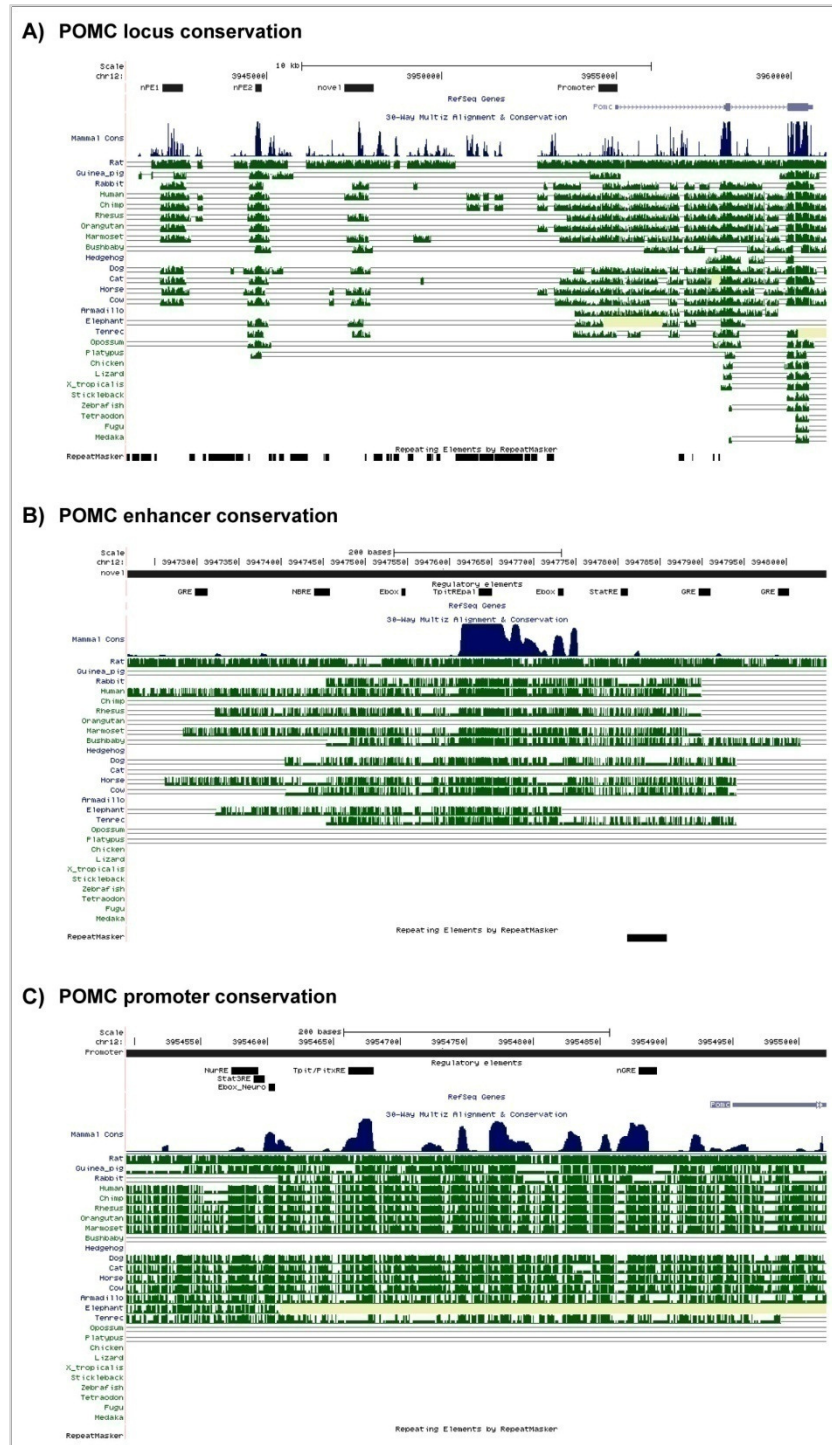


Figure 2.S1. Activity of the POMC promoter and/or -7kb enhancer upon lipofection into the indicated cell lines.

	-7Kb Enhancer TpitREpal	Promoter Tpit/PitxRE
Mouse	ctgcctttgtagcgtactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	t-a-ggcctgc---ct <b>gcac</b> aggagc <b>ctaagcc</b> tctgtccag-t
Rat	ctgcctttgtaacgtactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	t-a-ggcctgc---ct <b>acaccc</b> aggatg <b>ctaagcc</b> tctgtccag-t
Guinea pig	=====	-----gacgggatgctaagcctccgtcc-g-a
Rabbit	ctgccttgta---act <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaga	g-c-cccaggct--gcc <b>acaccc</b> aagg <b>ctaagcc</b> tccggctcg-c
Human	ctgcctttgtaacgcactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	c-t-gcccggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> tccgcccg-t
Chimp	=====	c-t-gcccggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> tccgcccg-t
Rhesus	ctgcctttgtaacgcactc <b>acagcctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	c-t-gcccggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> tccgcccg-t
Orangutan	=====	c-t-gcccggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> tccgcccg-t
Marmoset	ctgcctttgtaacgcactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaatt-aa	g-a-gcccggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagc</b> tctctgcccg-t
Bushbaby	ctgcctttgtaacgcactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	=====
Dog	ctgtctatgtaacgcactc <b>acacccctggtgaca</b> ttttgcttttccaattaaa	g-c-tccaggcctaccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcca</b> cctgctcg-t
Cat	=====	g-c-ctaggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> gctgctcg-t
Horse	ctgtctttgtaacgcactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	g-t-gccaggcctgccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> gctgctcg-t
Cow	ctgtctctgttacgcactc <b>acacccctggtgaca</b> --tctcttttccaattaaa	c-cggccaggccagccc <b>acaccc</b> ggggg <b>ctaagcc</b> tcccgctca-c
Armadillo	=====	g-c-gc-----gggtg <b>ctaagcc</b> gcgcgcgcg-t
Elephant	ctgtccttgtaacgcattc <b>acacccctggtgaca</b> --ttgcttttctagt--at	NN
Tenrec	ctgtccttggaacgcatt <b>cgacccaggtaata</b> --ttgcttttccaattaaa	c-t-g-----gccccacgcg---
Opossum	=====	=====
Platypus	=====	=====

Figure 2.S2. Sequence alignments for POMC -7kb enhancer TpitREpal and promoter Tpit/PitxRE.





**Figure 2.S3. Extended comparison of sequence conservation in species for which DNA sequences of the POMC locus is available.**

**Chapitre 3 : Regulatory Network Analyses Reveal Genome-Wide  
Potentiation of LIF Signaling by Glucocorticoids and Define an  
Innate Cell Defense Response**

**Running title: Glucocorticoids potentiate LIF action**

David Langlais, Catherine Couture, Aurélio Balsalobre<sup>1</sup>, Jacques Drouin<sup>1</sup>

Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
Montréal QC H2W 1R7 Canada

<sup>1</sup>**Corresponding authors:** Jacques Drouin and Aurélio Balsalobre  
Laboratoire de génétique moléculaire  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110, avenue des Pins Ouest  
Montréal QC Canada H2W 1R7  
Tel: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575

## 3.1. Avant-propos

### 3.1.1. Publication

Cet article a été publié dans la revue PLoS Genetics en octobre 2008 (Langlais et al. PLoS Genet. 2008 Oct;4(10):e1000224. Epub 2008 Oct 17).

### 3.1.2. Contribution des auteurs

J'ai conçu et effectué la majorité des expériences et analyses bioinformatiques qui ont mené à cette publication. Aurélio Balsalobre m'a soutenu pour les multiples injections, ponctions, sacrifices et dissections nécessaires pour les expériences d'activation de la réponse de défense cellulaire innée chez la souris (Figure 3.7). Tandis que Catherine Couture a fait les immunobuvardages découlant de ces inductions en culture et *in vivo*. (figure 3.6B et 3.7A).

### 3.1.3. Contexte

Lorsqu'un stress inflammatoire survient, les cellules de la réponse immunitaire innée produisent des cytokines pro-inflammatoires pour activer les défenses de l'organisme. Celles-ci, et plus particulièrement LIF/IL6 activent l'axe HPA à tous les niveaux. Il en découle un accroissement de la synthèse et de la sécrétion de Gc par les glandes surrénales. Les Gc exercent alors une rétroaction négative sur l'axe, en plus d'avoir une action anti-inflammatoire et immunosuppresseur bien connue. L'action antagoniste de ces deux voies est bien connue au niveau de la transcription de *Pomc*, par contre qu'en est-il des autres gènes? Quel est l'effet global de ces voies sur la cellule corticotrope?

Pour répondre à ces questions, nous avons entrepris d'investiguer à l'aide de puce d'expression, les changements transcriptomiques engendrés par une exposition aigüe ou prolongée à LIF et/ou Dex. En plus des effets attendus, soit l'activation des éléments de la voie Jak-Stat par LIF et l'inhibition de la prolifération par Dex, nous avons découvert un

groupe de gène subissant une activation synergique dépendante d'une exposition prolongée aux deux signaux. Bien que la stimulation LIF ne contrôle que très peu de gènes par elle-même, elle a un effet de potentiation sur les Gc. Cette interaction synergique se reflète également au niveau du recrutement de Stat3 et de GR sur certaines séquences régulatrices (cette avenue sera développée en profondeur dans le chapitre 4). De façon très intéressante, ce groupe activé par la combinaison des deux voies incluent 83% de gènes préalablement impliqués dans la réponse immunitaire innée ou l'*acute phase response*. Cette réponse est activée dans tous les types de cellules en culture testés et capitalement, dans tous les tissus vérifiés. En résumé, ces travaux ont mené à l'identification d'une réponse qui est activée par toutes les cellules suite à un stress inflammatoire majeur. Nous avons appelé cette réplique de l'organisme, "Réponse innée de défense cellulaire". Par contre, le niveau d'implication de cette réponse par rapport à la réponse immunitaire innée reste toujours à déterminer, mais aucun outil nous permet de le faire à l'heure actuelle.

### 3.2. Summary

While the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) activates a general stress response by increasing glucocorticoid (Gc) synthesis, biological stress resulting from infections triggers the inflammatory response through production of cytokines. The pituitary gland integrates some of these signals by responding to the pro-inflammatory cytokines IL6 and LIF and to a negative Gc feedback loop. The present work used whole-genome approaches to define the LIF/STAT3 regulatory network and to delineate cross-talk between this pathway and Gc action. Genome-wide ChIP-chip identified 3 449 STAT3 binding sites, whereas 2 396 genes regulated by LIF and/or Gc were found by expression profiling. Surprisingly, LIF on its own changed expression of only 85 genes but the joint action of LIF and Gc potentiated the expression of more than a thousand genes. Accordingly, activation of both LIF and Gc pathways also potentiated STAT3 and GR recruitment to many STAT3 targets. Our analyses revealed an unexpected gene cluster that requires both stimuli for delayed activation: 83% of the genes in this cluster are involved in different cell defense mechanisms. Thus, stressors that trigger both general stress and inflammatory responses lead to activation of a stereotypic innate cellular defense response.

### **3.3. Author summary**

Global biological responses involve pleiotropic general components exhibited by many cells/tissues together with cell-specific responses. Typically, such responses are dependent on multiple signaling pathways that integrate different inputs to trigger concerted tissue/cell responses. In studying LIF action in the context of immune-endocrine regulatory interactions, we found that LIF regulates expression of a surprisingly small number of genes. In contrast, the mapping of LIF-activated STAT3 transcription factor recruitment by genome-wide ChIP-chip led to the identification of a much larger set of putative regulatory sites. In view of the cross-talk between cytokine and glucocorticoid (Gc) signaling in response to stress and inflammation, we investigated the contribution of Gc to LIF action. Interestingly, the discrepancy between the number of LIF-regulated genes and LIF-dependent STAT3 genomic targets was partly explained by widespread Gc potentiation of LIF action. We further show requirement on both signaling pathways to elicit a pleiotropic and stereotypic innate cellular defense response, together with cell-specific responses such as antagonism between cytokines and Gc on expression of pituitary POMC. Thus, this stereotypic innate cell defense response is defined by the convergence of pathways activated by the stress and inflammatory systems.

### 3.4. Introduction

The pituitary gland is at the center of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis that mediates the response to stress [1,2]. Under normal conditions, the stress response is an integrated collection of tissue responses that place the organism in a state of alertness in order to fight or flight in the face of aggression. The output of the HPA axis during the stress response is exerted by circulating glucocorticoids (Gc). Indeed, Gc are synthesized by the adrenals in response to pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) which itself is responsive to hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) that integrates neural inputs into this neuro-endocrine pathway. Gc exert their metabolic effects and a stress response through action on a wide range of tissues including liver, muscle and adipose tissues. The metabolic effects of Gc are profound and failure to maintain Gc levels within the normal range as in Addison disease (hypocortisolism) results in weight loss, muscle weakness, fatigue and low blood pressure. Cushing syndrome is caused by excess Gc and in Cushing disease, this excess is due to pituitary corticotroph adenomas. Cushing syndrome is associated with accumulation of body fat, cardiovascular and metabolic effects that can ultimately lead to hypertension, diabetes and osteoporosis [3]. It is therefore critical that activation of HPA axis and Gc synthesis be restored to normal levels following the stress response. Negative feedback is exerted by Gc themselves both at the level of hypothalamus where they repress transcription of the CRH gene and release of CRH, and at the pituitary level where they repress transcription of the pro-opiomelanocortin (*Pomc*) gene and the release of POMC-derived ACTH [1].

The inflammatory response is a response to biological stresses and various aggressions including those caused by infections [4]. Many effects of the response to inflammation are mediated through cytokines that act on multiple tissues and importantly on the HPA axis. Indeed, inflammation-induced cytokines, such as IL6, stimulate hypothalamic production of CRH and act directly on pituitary corticotroph cells to stimulate *Pomc* gene transcription and ACTH release. LIF, a member of the IL6 family, also contributes to stimulation of POMC expression, both during development and in adult

function [5]. At the level of pituitary corticotroph cells, the action of LIF and IL6 are additive with those of hypothalamic CRH [6]. The HPA axis is thus at the center of the so-called immuno-neuroendocrine interface [7].

The action of LIF/IL6 in pituitary corticotroph cells was shown to be mediated in part through activation of STAT3 [8]. STAT3 action on the *Pomc* promoter was mapped to a composite regulatory element that also contains the NurRE, a binding site for dimers of orphan nuclear receptors of the Nur subfamily [9,10]. The Nur subfamily of orphan nuclear receptors includes NGFI-B (Nur77), NURR1 and NOR1 [11] and it was shown that homodimers or heterodimers between members of this subfamily can activate the NurRE in response to CRH as long as at least one moiety of the dimers is NGFI-B [12-14]. Thus, a composite regulatory element integrates LIF/IL6 and CRH signaling.

Gc repress *Pomc* gene transcription and in particular, antagonize *Pomc* activation by CRH and LIF [15]. Feedback repression of the *Pomc* gene by the Gc receptor (GR) is mainly exerted at the level of the NurRE/Stat3 composite regulatory element [16,17]. GR repression at the NurRE involves a mechanism of trans-repression that depends on protein:protein interactions between GR and NGFI-B, rather than direct GR contact with DNA [16]. Further, the weak direct interaction between GR and NGFI-B requires the presence of the Swi/Snf ATPase Brg1 for stable formation of a trans-repression complex [18]. Brg1 is also required to recruit HDAC2 to this repressor complex and this repression involves chromatin remodeling. Thus, the NurRE/Stat3 regulatory element of the *Pomc* gene is a critical target for most stimulatory and inhibitory inputs into this system.

In the present work, we have used whole-genome approaches to identify STAT3 target sites as revealed by ChIP-chip analysis using whole-genome tiling arrays [19-21] and to correlate these with the transcriptome of LIF and Gc responses. These analyses defined gene clusters that contribute to the repressor effects of Gc on corticotroph cell function, in particular the inhibitory Gc effect on cell proliferation. Most interestingly, the work



revealed a class of genes that have delayed responses to LIF+Gc: a large number of these genes contribute to the cell defense response. Using a highly LIF- and Gc-dependent gene of this group, lipocalin 2 (Lcn2), we show synergistic recruitment of STAT3 and GR at a genomic regulatory module that integrates LIF and Gc responses. Further, LIF and Gc synergism is exerted on Lcn2 expression and other cell defense genes in various tissues in vivo and the gene profile of this action is very similar to that of LPS, a strong inducer of the inflammatory response. Collectively, this work highlights a general cell defense response that is dependent on the combined action of LIF or other cytokines released during inflammatory and immune responses and Gc produced by the HPA axis. This delayed stimulatory Gc action likely overlaps with hepatic acute-phase and innate immune responses [22,23], and it contrasts with the anti-inflammatory properties of these steroids used therapeutically.

## 3.5. Results

### 3.5.1. LIF/STAT3 target genes

In order to assess the cellular response to LIF/STAT3, the time course of STAT3 activation in response to LIF in AtT-20 cells, a model of mouse pituitary corticotroph cells, was determined by Western blot analysis of phospho-STAT3 (Fig. 1A). This analysis indicated a peak of phospho-STAT3 at about 20 minutes following LIF treatment. In principle, activated phospho-STAT3 should lead to promoter occupancy of STAT3 target genes and thus the time course of promoter recruitment was assessed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) in AtT-20 cells for a panel of STAT3 target genes (Fig. 1B). For most of these genes, maximal promoter occupancy was achieved between 10 and 20 minutes after LIF stimulation.

Genomic targets of LIF activated STAT3 were therefore identified by ChIP-chip analysis of AtT-20 cells treated with LIF for 20 minutes. Three independent STAT3 ChIP and control IgG samples were hybridized on the Affymetrix Mouse Tiling 2.0R Array Set, covering the entire non-repetitive mouse genome with a 35 bp resolution. The raw data were processed using the MAT software package [24]. A threshold P value of  $10^{-5}$  was used to select peaks of specific STAT3 immunoreactivity throughout the genome, yielding a calculated false discovery rate (FDR) of 3.3% [25]. This analysis revealed a total of 3 449 putative STAT3 target sites in the mouse genome, after removal of 74 sites by redundant sequence filtering (complete list in Table S1). The chromosomal distribution of these sites is shown in Figure 1C. The mean length of genomic regions exhibiting a positive ChIP signal is 804 bp. In order to test the reliability of those results, 42 genomic sites with P values ranging from  $10^{-5}$  to  $10^{-148}$  were randomly picked and STAT3 recruitment at each of these sites was tested on separate ChIP using QPCR: all 42 tested sites were confirmed to be positive (Fig. 1B-C and data not shown).

### **3.5.2. STAT3 binding sites preferentially localize close to transcribed sequences**

The position of STAT3 binding sites on the mouse genome was analyzed relative to transcription start sites (TSS) of UCSC known genes. They were mapped either as upstream relative to known TSS, downstream from known TSS within the gene body or relative to the 3' end of UCSC known genes (Fig. 2A). This analysis clearly showed a preferential localization of STAT3 binding sites within 5 kb of TSS, with 19.4% of the total site number within this interval and 9.4% within 1 kb of TSS. Tiling array data for specific loci previously known to have STAT3 binding sites are also shown in Figure 2. For example, the promoter region of the *Pomc* gene is known to have a STAT3 binding site at -387/-379 bp [8-10], and the tiling array data show a peak of STAT3 recruitment over this promoter region (Fig. 2B). Similarly, the promoter of the *Stat3* gene itself is known to have a STAT3 binding site, and thus is subject to auto-regulation. The tiling array shows a peak of STAT3 recruitment (Fig. 2C) that overlaps the reported STAT3 binding site at -338/-331 bp [26]. The *Socs3* gene is involved in negative feedback regulation of STAT3 signaling and the *Socs3* promoter has a STAT3 binding site at -64/-72 bp [27] that overlaps the observed peak of STAT3 recruitment (Fig. 2D). In addition to these sites, the tiling array data revealed numerous other STAT3 binding sites in the *Stat3/Stat5* and *Socs3* loci; the biological relevance of these putative regulatory regions will need to be evaluated. Interestingly, STAT3 binding sites were found in close proximity to all *Stat* genes, except *Stat6*. Finally, STAT3 binding sites were found in the vicinity and promoter region of some microRNA genes, for example around the *miR-21* gene (Fig. 2E) that was implicated in the STAT3-dependent growth promotion activity of *IL6* [28].

The DNA binding sequence for STAT3 has been defined experimentally through the work of numerous investigators. For example, the binding motif used by the Genomatix software to identify putative STAT3 binding sites is shown in Fig. 2F and compared with a consensus that we derived from 24 published genomic STAT3 binding sites. We have used two non-biased algorithms designed to identify recurring motifs within the STAT3-bound

DNA fragments (Fig. 1C); the AlignAce algorithm and the Consensus algorithm identified a consensus binding motif that is very similar to the previously documented binding sites for STAT3 (Fig. 2F). No other motif was found to be enriched within the ensemble of STAT3 genomic targets. We also searched the 3 449 STAT3 target sequences for known transcription factor binding motifs with MatInspector (Genomatix) software and again, we found no other enriched motif compared to 10 randomly picked genomic sequences of the same total length.

### **3.5.3. Reciprocal co-potentialiation of STAT3 and GR recruitment to genomic target sites**

In AtT-20 cells, the stimulatory effect of LIF on *Pomc* gene transcription is antagonized by Gc and GR. In order to assess whether this antagonism is reflected at the level of STAT3 genomic recruitment, we performed STAT3 ChIP in cells treated either with LIF, the synthetic Gc dexamethasone (Dex) or both for 20 minutes and determined STAT3 recruitment by QPCR for a panel of STAT3 target genes (Fig. 3A). While some genes such as *Pomc* showed moderately enhanced STAT3 recruitment in response to LIF+Dex compared to LIF, other genes such as metallothionein 2 (*Mt2*) revealed marked synergism in STAT3 recruitment in cells treated with LIF+Dex (Fig. 3A). This suggests that recruitment of one factor potentiates recruitment of the other factor to target regulatory sequences. About a third of tested genes showed greater STAT3 recruitment for LIF+Dex compared to LIF treated cells while another third showed decreased recruitment and the remaining third showed no effect. In order to assess whether potentiation of STAT3 recruitment is reciprocal, similar ChIP analyses were performed for GR recruitment to the same loci and these analyses again showed potentiation of GR recruitment following LIF+Dex treatment for the same subset of genes, such as *Pomc* and *Mt2* (Fig. 3B). It is noteworthy that so many randomly chosen STAT3 target loci are also Gc/GR targets. Sequential ChIP were performed for STAT3 and GR on three loci using AtT-20 cells treated with LIF+Dex. These analyses confirmed that for the *Pomc*, *Mt2* and *Lcn2* loci,

both GR and STAT3 are present together on the same chromatin fragments (Fig. 3C). These data clearly suggest that a subset of LIF target genes may be subject to the combined action of LIF and Gc.

#### **3.5.4. Synergistic action of LIF and glucocorticoids**

In order to correlate STAT3 genomic binding sites with regulation by LIF or Gc of adjacent candidate target genes, we performed expression profiling experiments. Duplicate RNA samples from AtT-20 cells treated with/without LIF and/or Dex for 3h and 18h were hybridized on Affymetrix MOE expression arrays. The data were pre-processed using GC-RMA normalization within the FlexArray software [29,30]. A total of 2 396 regulated probesets were identified (complete data provided in Table S2) following a Local-pooled-error test, using a 2-fold change threshold and a P value smaller than 0.05 [31]. The number of genes up or down regulated by these treatments is presented in Figure 4A. Whereas a large number of genes were up and down regulated by Dex, few genes are affected by LIF (mainly up regulated). This low number of modulated genes was unexpected because we identified 3 449 STAT3 binding sites in presence of LIF. Most significantly, a large number of new genes are regulated in response to both LIF+Dex, at both 3h and 18h post-treatment (Fig. 4C, D). It is noteworthy that early and late response genes are quite different with a limited number of genes showing sustained changes of expression at both 3h and 18h (Fig. 4B). These data clearly suggest that a class(es) of gene(s) is dependent on both LIF and Gc for regulation.

In order to correlate LIF regulated genes identified in these profiling experiments with genomic sites of STAT3 binding identified by ChIP-chip, we searched for STAT3 binding sites within 5 or 50 kb of the TSS of hormone responsive genes (Fig. 4E). This analysis showed that 62/42% of LIF regulated genes have STAT3 binding site within 5 kb of their TSS, and 76/64% within 50 kb of the TSS, at 3h/18h respectively. This proportion is smaller for Dex and LIF+Dex-regulated genes, reaching about 30% of genes within 50

kb of TSS. This is higher than the random expectation value of 18%, calculated for all genes on the Affymetrix MOE 2.0 microarray.

### **3.5.5. Cell response to stress is activated by joint action of LIF and Gc**

Clustering analysis using Smooth correlation in the Genespring GX 7.3 software was performed on the expression profiling data of hormone-treated AtT-20 cells. A heat map (Fig. 5A) of this clustering identified groups of genes that are similarly regulated (Fig. 5B). Clustering analysis was performed using the Smooth correlation K means approach. These clusters of co-regulated genes contain from 77 to 549 probesets (Table S3). The DAVID software was used to search for over-represented Gene Ontology (GO) classes of gene functions [32]. Clusters #1, 3, 4 and 8 did not contain significant numbers of genes associated with similar biological processes (GO gene lists in Table S4). Cluster #9 regroups genes that are repressed by Dex at both time points: this cluster contains significant enrichment for genes encoding transcription and nuclear functions ( $P \leq 10^{-5}$ ) and cell processes ( $P \leq 10^{-6}$ ). Interestingly, cluster #7 is highly enriched in genes involved in control of cell cycle and mitosis ( $P \leq 10^{-14}$ ) and these genes (Fig. 5C) are primarily repressed by Dex at 18h (Fig. 5A and 5B). It is reassuring to find this cell cycle and mitosis cluster associated with Gc repression since the growth of AtT-20 cells is known to be inhibited by these steroids [33].

The most striking cluster to be identified in this work is represented by the 179 probesets of cluster #2 (Fig. 5B). These genes have the particularity of being specifically upregulated at 18h by the combined action of LIF+Dex, but not by Dex or LIF alone. Gene Ontology analysis of this cluster reveals a highly significant ( $P \leq 10^{-8}$ ) number of genes that are associated with cell defense response (Fig. 5D). To a lower extent, we found other genes implicated in cell defense response in cluster #5 (Table S4), which contains the genes activated by LIF at 3h or 18h independently of the presence of Gc. The delayed (18h) response of cluster #2 genes is suggestive of a secondary response. In order to ascertain

whether this is the case, we assessed responsiveness to LIF+Dex of a representative panel of cluster #2 genes in the presence/absence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Fig. 5E). This experiment clearly showed that the bulk of this LIF+Dex response is secondary and dependent on de novo synthesis of an intermediate regulator(s). Of the genes that are subject to synergistic activation by LIF+Dex, the *Lcn2* gene showed the most striking potentiation.

### **3.5.6. Lipocalin 2, a highly LIF- and glucocorticoid-dependent gene**

In order to validate the great synergism observed between LIF+Dex effects on *Lcn2* mRNA levels in the microarray analyses, we performed RT-QPCR quantification of *Lcn2* mRNA in AtT-20 cells treated for 18h with either or both agents. These quantifications indicate that the *Lcn2* gene is responsive to LIF alone (23-fold), highly induced by Dex (10 278-fold), but phenomenally subject to synergism between these two signals (156 026-fold) as shown on a log scale in Figure 6A. This striking upregulation is also revealed by *Lcn2* Western blot analysis of AtT-20 cell culture medium (Fig. 6B). No STAT3 binding was found at the *Lcn2* promoter (data not shown), but the STAT3 whole-genome ChIP-chip experiment revealed significant enrichment at about 22 kb upstream of the *Lcn2* gene within an intergenic region (Fig. 6C) and no other gene is regulated by either LIF and/or Dex in the *Lcn2* vicinity. In order to assess the possibility that this STAT3 binding region might represent a regulatory sequence for *Lcn2* expression, we performed analytical ChIP for STAT3 and GR in this genomic region using cells treated or not with hormones. These data indicated significant potentiation of STAT3 and GR recruitment over this putative regulatory region (Fig. 3A, 3B). Sequential ChIP analyses also demonstrate STAT3 and GR co-occupancy on this genomic region (Fig. 3C). This -22 kb region may therefore act as a hormone sensitive enhancer for regulation of *Lcn2* expression. In order to test this hypothesis, a luciferase plasmid reporter was constructed with/without the putative 1133 bp enhancer domain and assessed for transcriptional activity upon transfection in AtT-20 cells. This assay revealed marked transcriptional activity of the putative enhancer (Fig. 6D) and

further, the enhancer-containing reporter plasmid was found to be responsive to LIF, Dex and LIF+Dex treatment (Fig. 6E). Thus, these data clearly suggest that an enhancer is present at -22 kb upstream of the *Lcn2* gene and that this enhancer is in part responsible for the marked synergistic activation of *Lcn2* transcription by LIF+Dex. Notwithstanding the likely involvement of a cycloheximide-dependent regulator(s) for long term *Lcn2* induction (Fig. 5E), the data implicate direct actions of STAT3 and GR at the *Lcn2* enhancer.

*Lcn2* is a secreted protein that is present in blood and its plasma concentration is greatly enhanced following bacterial challenges [34,35]. In order to test whether LIF+Dex also stimulate *Lcn2* expression in vivo, mice were injected with either LIF, Dex or LIF+Dex and analyzed for serum *Lcn2*. The effect of LIF+Dex was compared to the documented stimulation of *Lcn2* expression by lipopolysaccharides O127:B8 (LPS). While Dex on its own did not stimulate serum *Lcn2* at 3h of treatment, injection of LIF led to a small increase in serum *Lcn2* but the combined LIF+Dex treatment was even more effective, approaching the response obtained with LPS injection (Fig. 7A). At 20h of treatment, a small response to Dex was observed but again the greatest increase was observed in LIF+Dex treated mice.

Circulating *Lcn2* is likely produced by a variety of sources including liver [34]. It is therefore possible that the synergistic stimulation of *Lcn2* gene expression observed in AtT-20 cells may be a reflection of a general cellular response to these agents. In order to test this, RT-QPCR was used to measure *Lcn2* mRNA levels in pituitary and liver of mice injected with LIF, Dex and LIF+Dex (3 and 20h), together with a reference group of mice injected with PBS or LPS (Fig. 7B to 7E). These data indicate that the synergistic action of LIF+Dex is not unique to the pituitary. Liver production of *Lcn2* could thus account for a significant proportion of blood *Lcn2* observed in animals treated with LIF+Dex.

To assess whether the cell defense mechanism activated in AtT-20 by LIF+Dex (cluster #2) is active and generalized in vivo, we randomly selected genes within this



cluster. mRNA levels were measured by RT-QPCR in five tissues (pituitary, liver, testis, lung and heart) from mice treated for 20h with PBS, LIF+Dex or LPS. As above, this experiment was performed in mice that have normal Gc levels using a pharmacological dose of Dex together with LIF. In all five tissues, the two treatments produced comparable patterns of gene activation (Fig. 7F). It thus appears that the cell defense mechanisms activated by LIF+Dex are very similar to those activated by LPS, in agreement with the stimulatory effect of LPS on cytokines, ACTH and Gc [36]. Many genes synergistically activated by LIF+Dex are part of the hepatic acute-phase and innate immune response [22,23].

In view of this widespread *in vivo* response, we verified whether similar responses would be observed in cell lines other than AtT-20. Furthermore, we tested the responses to the LIF-related cytokine IL6 that is also induced during the inflammatory response. We used the 10T½ cells that co-express the LIF and IL6 receptors, like AtT-20 cells, but also the NIH 3T3 cells that only express the IL6 receptor, as shown by RT-QPCR (Fig. 7G). These analyses showed LIF+Dex as well as IL6+Dex synergism in all three cell lines (Fig. 7H).

### 3.6. Discussion

The present work was undertaken to define the action of LIF and related cytokines such as IL6 on corticotroph function in the context of immuno-neuroendocrine interactions. Surprisingly, LIF signaling on its own was found to modulate a very limited gene subset. Indeed, most LIF-regulated genes are similarly activated at 3h and 18h, they are found in cluster #5 (77 probesets representing 57 unique genes) and many have been involved in corticotroph signaling and *Pomc* transcription, such as *Jak3*, *Stat1*, *Stat3*, *Socs3*, *Junb*, *c-Fos*, *Cebpd* (Table S3). The majority of these genes recruit STAT3 close to their TSS (Fig. 4E) and they contain a canonical STAT3 binding site (Fig. 2F). Collectively, they define a pathway for LIF/STAT3-dependent activation of transcription but the small number of genes involved contrasts with the much larger number of genomic STAT3 recruitment sites (Fig. 1C). This discrepancy is largely explained by the great number of LIF-sensitive genes that are potentiated by Gc (Fig. 4). In contrast to LIF, Gc on their own affect a large number of genes, consistent with other genomic studies of Gc action [37,38]. Many of these genes respond transiently to Dex either at 3h (cluster #4 genes are activated, cluster #9 repressed) or at 18h (cluster #1 genes are activated and #7 repressed) but other gene clusters exhibit sustained changes in expression (activation for cluster #3 and repression for cluster #6). But the most interesting gene clusters to arise from this analysis show delayed (18h) responses that require both Dex and LIF (cluster #2 for activated genes, cluster #8 for repressed genes). In particular, cluster #2 is enriched in genes involved in different cellular responses to aggression or stress, including genes that are part of the innate immune response and of the hepatic acute-phase response.

#### 3.6.1. Mechanism of STAT3 action

The mapping of STAT3 binding sites on the mouse genome in LIF-stimulated cells identified 3 449 high confidence sites (Fig. 1). This number stands in stark contrast with the relatively limited number of LIF-regulated mRNAs identified in profiling experiments (Fig. 4). Although it is possible that a large number of target genes are regulated less than the 2-

fold threshold of expression profiling data, it is more likely that this small number of LIF-regulated genes reflects the dependence of STAT3 on other transcription factors for activity. This action includes a moderate stimulatory effect on *Pomc* gene expression: within the context of *Pomc* regulation, LIF action is mostly meaningful in association with the stimulatory action of CRH signaling and the downstream Nur orphan nuclear receptors [10].

Nonetheless, it appears that activation of STAT3 by phosphorylation (Fig. 1A) leads to promoter occupancy of a large number of target genes (Fig. 1B, 1C), independently of other signaling pathways. These STAT3 targets include cell-specific genes such as *Pomc* (Fig. 2B) and genes involved in STAT3 signaling itself (Fig. 2C, 2D). The STAT3 target genes defined through ChIP-chip analysis also include a large number of genes that are co-regulated by Gc. Independently of this co-regulation, non-biased analysis of STAT3 genomic binding regions only revealed one conserved sequence motif, the STAT3 binding site itself (Fig. 2F). This conserved motif is entirely consistent with the previously defined STAT3 binding site [27,39]. It is noteworthy that this analysis did not reveal enrichment of any other motif: it might have been expected that some transcription factor binding motifs might have been enriched in association with STAT3 targets since STAT3 has already been shown to act in association with a variety of factors including GR [40]. Failure to detect particular enrichment of one binding motif with STAT3 binding sites may reflect the fact that STAT3 binding sites is associated with a large array of conserved binding motifs for many structural classes of DNA binding proteins and/or that these other factors act by protein:protein interactions with STAT3. The localization of binding peaks within STAT3 binding regions corresponded quite closely to the position of known STAT3 binding sites (Fig. 2B to 2E). For example in the *Pomc* promoter (Fig. 2B), a binding peak was observed at -465 bp whereas the published STAT3 binding site is located at -387/-379 bp [8-10].

### **3.6.2. Potentiation of LIF action by Gc**

A surprising finding of this study has been the large number of genes that exhibit potentiation of LIF effects (activation or repression) by Gc (cluster #1, 2, 7 and 8). The Venn diagrams (Fig. 4C and 4D) clearly illustrate the large number of genes that are subject to Gc potentiation of LIF activity. Interestingly, a similar proportion (about 2/3) of randomly chosen STAT3-binding loci showed enhancement or antagonism of STAT3 recruitment in presence of LIF+Dex compared to LIF alone (Fig. 3A). Also, many of these loci showed enhanced GR recruitment in LIF+Dex compared to Dex-treated cells (Fig. 3B). The potentiation of GR recruitment to STAT3 loci may involve direct protein interactions between these effectors as such interactions have been documented [41]. Direct STAT3:GR interactions may cause transcriptional synergism [41] but they may also reflect transcriptional antagonism as observed for trans-repression of LIF and/or CRH-induced *Pomc* transcription by GR. Indeed, Gc repress *Pomc* transcription without direct DNA binding by GR: the present work showed enhanced GR and STAT3 recruitment to the *Pomc* promoter in Dex+LIF-treated cells compared to Dex or LIF alone (Fig. 3A, B) and we have similarly showed enhanced NGFI-B and GR recruitment to this promoter in CRH+Dex-treated cells compared to either treatment [18]. The potentiation of genomic recruitment of one factor by another is thus a clear indication of transcriptional interactions, but it does not predict whether an interaction may be synergistic or antagonistic on transcription.

### **3.6.3. Inhibition of cell cycle and mitosis by glucocorticoids**

In addition to its repressor effect on *Pomc* transcription [42], Gc inhibit the growth of AtT-20 cells [33]. Cluster #7 genes are repressed by Dex at 18h but not 3h irrespective of the presence of LIF and it is enriched in genes involved in cell cycle control and mitosis (Fig. 5A-C). This gene cluster therefore contains the ensemble of gene functions that may work coordinately to repress cell proliferation. It will be interesting to assess whether a

similar group of genes is also involved in the growth inhibitory effects of Gc on immune or other cells.

#### **3.6.4. The cell defense response**

A unique cluster of genes was identified in the present work and is represented by cluster #2 (Fig. 5D). This 179 probesets (150 genes) cluster is highly enriched in genes involved in cell defense response. Upon removal of 40 genes of unknown function, the remaining 110 genes with known or suspected function were queried for involvement in various processes. Of these, a total of 91 genes were previously associated with various cell defense mechanisms, such as innate responses to viruses or to bacteria, or acute phase response. This group thus represents 83% of genes with documented function in cluster #2. The group includes genes of the innate response to viral infection that are interferon induced (ISGs) [43]: examples of this group include the six 2'-5'-oligoadenylate synthetase (Oas) genes, the Mx1 and Mx2 genes, Irf7 and Pkr (Fig. S1). Interestingly, the interferon genes themselves and Toll-like receptors were not induced by LIF+Dex. Similarly, the bacterial infection and acute phase response genes [44,45] Tpl2, Saa3, Haptoglobin and Serpina3 were all found in cluster #2 but the  $\alpha$ 2-macroglobulin gene was not. It should be mentioned however that other ISGs and cell defense genes were induced in these experiments under different regulatory modalities and therefore they are found in clusters other than #2. The genes of cluster #2 thus represent an innate defense mechanism that is triggered by joint activation of the inflammatory response and HPA axis. This innate cell defense response may be evolutionary conserved as it has been suggested for the functions of Mx and Oas genes [46,47].

The most striking example of a LIF+Dex-dependent gene is Lcn2 that is induced more than 150 000-fold in AtT-20 cells (Fig. 6A). Whereas the Lcn2 promoter does not exhibit any STAT3 or GR recruitment (Fig. 6C and data not shown), their activities are likely conferred, at least in part, upon the Lcn2 gene by a putative enhancer element

identified 22 kb upstream of the *Lcn2* gene (Fig. 6C-E). Interestingly, the putative *Lcn2* enhancer exhibits potentiation of GR binding upon LIF/ STAT3 action and the reverse (Fig. 3). However, it is clear that direct action of STAT3 and GR on the *Lcn2* locus is not the only mechanism of activation since at 18h post-stimulation, most of the response to LIF+Dex is dependent on de novo protein synthesis (Fig. 5E). In fact, most of cluster #2 genes exhibit an analogous secondary response.

*Lcn2* regulation thus exemplifies a cell defense response that appears to be shared by many cells and tissues [48,49]. We have ascertained this *in vivo* by injection of LIF, Dex, or both in normal mice and compared these responses with LPS challenge in pituitary and liver. *Lcn2* expression was induced by LIF in both tissues and Dex treatment exerted synergistic activation at 3h post-treatment (Fig. 7A-E). Less synergism of Dex action with LIF was observed *in vivo* compared to tissue culture cells (Fig. 6A), but the *in vivo* experiments were conducted in mice with normal adrenal function and Gc levels.

In order to test the responsiveness of cluster #2 genes in various tissues *in vivo*, a similar experiment was conducted in mice injected with LIF+Dex compared to LPS-injected animals. As shown graphically in Figure 7F, the response patterns to these agents are similar in five tissues. It is noteworthy that tissues not usually associated with the acute phase response, share this response pattern. These conclusions are also supported by experiments using different cell lines (Fig. 7G and 7H). Thus, LIF/IL6 and Gc appear to elicit an innate cell defense response. With regards to Gc, this positive action has been interpreted as pro-inflammatory [22] but it may be more appropriately interpreted as a local cell defense response that is distinct and complementary to the systemic anti-inflammatory actions of Gc. It is interesting to suggest that the innate cell defense response identified in the present work may constitute an ancestral defense mechanism.

## **3.7. Materials and methods**

### **3.7.1. Cell culture and transfection**

AtT-20 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The cells were transfected with 500 ng of luciferase reporter construct using Lipofectamine reagent (Invitrogen). The following day, cells were stimulated for 4h with either PBS as vehicle, LIF 10 ng/ml (Chemicon), dexamethasone (Dex)  $10^{-7}$  M (Sigma), or a combination of LIF+Dex.

### **3.7.2. Western blots**

Whole cell extracts (WCE) were prepared and analyzed on SDS-PAGE as described [18]. Western blots were revealed using STAT3 (sc-482), phospho-STAT3 (sc-7993),  $\alpha$ -Tubulin (sc-32293) and Lcn2 (sc-50351) antibodies from Santa Cruz Biotechnology.

### **3.7.3. Chromatin immunoprecipitation (ChIP), sequential ChIP and QPCR**

AtT-20 cells were grown to 60-70% confluence and stimulated with 10 ng/ml LIF and/or  $10^{-7}$  M Dex for 20 min. ChIP were performed as described previously [50], with little modifications. Briefly, chromatin was crosslinked with 1% formaldehyde added directly to the culture medium (5 min at room temperature). Crosslinking was stopped with glycine 125 mM in PBS for 5 min, followed by chromatin preparation. Sonicated chromatin was immunoprecipitated with either rabbit IgG (Sigma G2018), GR (sc-1004) or a combination of phospho-STAT3 (sc-7993) and STAT3 (sc-482) antibodies and collected using protein-A/G beads (Santa Cruz Biotechnologies). After washes and decrosslinking, DNA was purified using QIAquick columns following manufacturer's directives. For sequential ChIP, chromatin immunoprecipitates were gently eluted with elution buffer (10 mM Tris-HCl pH8, 1% SDS) for 20 min at 65°C. Supernatants were diluted to 0.5% SDS, 0.5% Triton, 0.05% NaDOC, 10 mM Tris-HCl pH8 and 140mM NaCl, and complemented

with 0.5 mg/ml BSA, 0.05 mg/ml yeast tRNA and 0.025 mg/ml phage  $\lambda$  DNA. The second immunoprecipitation was performed as described above for single CHIP. Enrichment was assessed by QPCR with Qiagen QuantiTect SYBR green PCR kit. The list of oligonucleotides used is available upon request.

#### **3.7.4. Whole-genome tiling arrays**

Three independent STAT3 and control IgG CHIP samples were amplified, fragmented, biotin labeled and hybridized on Affymetrix Mouse Tiling 2.0R Array Set as recommended by the company. Raw data were processed with the MAT software [24] to calculate peak intensity and determine statistically significant enrichment of specific genomic regions. A P value cut-off of  $10^{-5}$  was applied and redundant sequences were subtracted following BLAT search. Thus, the STAT3 whole-genome CHIP-chip yielded 3 449 sites with a predicted false discovery rate (FDR) of 3.3%.

#### **3.7.5. Binding motif analyses**

De novo motif analyses were done using two different sequence alignment algorithms. First, 800 bp masked sequences were retrieved from UCSC genome browser for each of the STAT3 binding sites: those included 400 bp upstream and downstream of MAT defined enrichment peaks. These sequences were processed using AlignAce [51] and Consensus [52]. The graphical representation of the position weight matrices obtained from these analyses were generated with WebLogo [53].

The same sequence set was challenged against all known transcription factor binding motifs using the MatInspector software (Genomatix). The resulting occurrence of each motif was compared to the mean number of predicted binding sites in 10 randomly picked genomic sequence sets.



### 3.7.6. RNA and expression arrays

Total RNA was extracted from AtT-20 cells previously treated for 3 or 18h with vehicle, 10 ng/ml LIF and/or 10<sup>-7</sup> M Dex, using RNeasy columns (Qiagen). Two biological replicates of each condition were hybridized on Affymetrix MOE 430 2.0 arrays, except for Dex 18h that was hybridized on the previous version of MOE A and B arrays. Hybridization and scanning were done at the McGill University and Genome Québec Innovation Centre. Data were normalized using GC-RMA [29,30] on the FlexArray application. The variance between replicates is smaller than 0.001. We used the Local-pooled-error test (LPE) to assess differential gene expression between control and hormone treated cells [31]. Gene expression with fold changes greater than 2 ( $P \leq 0.05$ ) were considered significant.

Genes from cluster #2 were picked randomly for RT-QPCR validation. AtT-20 cells were treated with LIF+Dex (10 ng/ml and 10<sup>-7</sup> M respectively) in presence or absence of cycloheximide at 10 µg/ml (Sigma). We also treated AtT-20, 10T½ and NIH 3T3 cells with LIF (10 ng/ml), IL6 (10 ng/ml), Dex 10<sup>-7</sup> M alone or in combination for 18h. Total RNA was extracted as described above and gene expression was quantified with the Qiagen OneStep RT-QPCR kit.

### 3.7.7. Clustering and Gene Ontology analysis

The genes with expression changes in at least one condition (LIF, Dex, LIF+Dex, at 3h or 18h) were uploaded into GeneSpring GX 7.3 software (Agilent) for analysis. Smooth correlation was used to do unbiased clustering. Following this, K-mean clustering using Smooth correlation was used to separate genes with the same expression reactivity. We determined that 9 clusters is the most segregating setting for our dataset. The gene lists extracted from those 9 clusters were uploaded into the DAVID website [32] to search for enriched biological processes. The Affymetrix MOE 430 2.0 gene list was used as

reference. Thresholds were set at a minimum of 5 genes per Gene Ontology class and a P value  $\leq 0.001$ .

### **3.7.8. *In vivo* experiments**

Groups of six CD1 male mice aged between 10 and 14 weeks were injected intraperitoneally with either PBS, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  LIF, 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Dex, LIF+Dex or 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  LPS (O127:B8, Sigma) and sacrificed after 3h. Similar groups were sacrificed at 20h following 5 injections, except for LPS (only one LPS injection and 4 PBS injections). Mice were anaesthetized with 0.025 ml/g of avertin 2.5%. 1 ml of blood was collected by cardiac puncture. Serum proteins (100  $\mu\text{g}$ ) were loaded onto SDS-PAGE and Lcn2 protein was revealed by Western blot. Lcn2 is a small 26 kDa protein and the upper part of gels was stained with Coomassie blue as loading control. Pituitary, liver, testis, lung and heart were dissected out following sacrifice. Total RNA was extracted from these tissues using RNeasy column as described by Qiagen. cDNA was produced using SuperScript III (Invitrogen) and gene expression was measured by QPCR with Qiagen QuantiTect SYBR green. Lcn2 and other mRNA levels were normalized in respect to  $\beta$ -actin mRNA. The oligos sequences are available upon request. Animal experimentation was approved by the IRCM Animal Care and Use Committee, in conformity with regulations of the Canadian Council on Animal Care.

### **3.8. Footnotes**

#### *Acknowledgements*

We are grateful to François Robert, Alain Bataille and their colleagues of the IRCM Molecular Biology Core, particularly Odile Neyret, for help in ChIP microarray analyses. The precious support of Gilles Corbeil and Pavel Hamet, CHUM, was essential for whole-genome tiling array processing. We thank Johanne Duhaime of the IRCM Bioinformatics Department and Victor Sementchenko of the Biocomputing Department at Affymetrix for their help with data analyses. The expert secretarial assistance of Lise Laroche was greatly appreciated.

#### *Funding*

This work was supported by grants from Génome-Québec, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and National Cancer Institute of Canada (NCIC).

#### *Disclosure statement*

The authors have declared that no competing interests exist.

### 3.9. References

1. Drouin J, Bilodeau S, Vallette-Kasic S. (2007) Of old and new diseases: genetics of pituitary ACTH excess (Cushing) and deficiency. *Clin Genet* 72: 175-182.
2. Dallman MF, Pecoraro NC, La Fleur SE, Warne JP, Ginsberg AB et al. (2006) Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res* 153: 75-105.
3. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F et al. (2003) Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: A consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5593-5602.
4. Karin M, Lawrence T, Nizet V. (2006) Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. *Cell* 124: 823-835.
5. Chesnokova V, Auernhammer CJ, Melmed S. (1998) Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* 139: 2209-2216.
6. Bousquet C, Ray DW, Melmed S. (1997) A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J Biol Chem* 272: 10551-10557.
7. Beishuizen A, Thijs LG. (2003) Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res* 9: 3-24.
8. Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S. (2000) Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106: 1417-1425.
9. Mynard V, Guignat L, Devin-Leclerc J, Bertagna X, Catelli MG. (2002) Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology* 143: 3916-3924.
10. Mynard V, Latchoumanin O, Guignat L, Devin-Leclerc J, Bertagna X et al. (2004) Synergistic signaling by corticotropin-releasing hormone and leukemia inhibitory factor bridged by phosphorylated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein at the Nur response element (NurRE)-signal transducers and

- activators of transcription (STAT) element of the proopiomelanocortin promoter. *Mol Endocrinol* 18: 2997-3010.
11. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
  12. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y et al. (1997) Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17: 5946-5951.
  13. Maira MH, 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.
  14. Maira MH, 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.
  15. Ray DW, Ren SG, Melmed S. (1996) Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* 97: 1852-1859.
  16. Philips A, Maira MH, Mullick A, Chamberland M, Lesage S et al. (1997) Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17: 5952-5959.
  17. 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.
  18. Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, Figarella-Branger D, Brue T et al. (2006) Role of Brg1 and HDAC2 in GR *trans*-repression of pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev* 20: 2871-2886.
  19. Robert F, Pokholok DK, Hannett NM, Rinaldi NJ, Chandy M et al. (2004) Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol Cell* 16: 199-209.

20. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW et al. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39: 311-318.
21. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR et al. (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38: 1289-1297.
22. Yeager MP, Guyre PM, Munck AU. (2004) Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 48: 799-813.
23. Schleimer RP. (2004) Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 1: 222-230.
24. Johnson WE, Li W, Meyer CA, Gottardo R, Carroll JS et al. (2006) Model-based analysis of tiling-arrays for ChIP-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12457-12462.
25. Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA et al. (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116: 499-509.
26. Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T et al. (2001) Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol* 21: 6615-6625.
27. Auernhammer CJ, Chesnokova V, Bousquet C, Melmed S. (1998) Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion. *Mol Endocrinol* 12: 954-961.
28. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J et al. (2007) Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 110: 1330-1333.
29. Wu Z, Irizarry RA. (2004) Preprocessing of oligonucleotide array data. *Nat Biotechnol* 22: 656-658.

30. Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. (2004) A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association* 99: 909-917.
31. Jain N, Thatte J, Braciale T, Ley K, O'Connell M et al. (2003) Local-pooled-error test for identifying differentially expressed genes with a small number of replicated microarrays. *Bioinformatics* 19: 1945-1951.
32. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W et al. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: 3.
33. Svec F. (1984) Glucocorticoids inhibit the growth of AtT-20 mouse pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 35: 33-40.
34. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA et al. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917-921.
35. Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A et al. (2006) Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1834-1839.
36. Hadid R, Spinedi E, Chautard T, Giacomini M, Gaillard RC. (1999) Role of several mediators of inflammation on the mouse hypothalamo-pituitary-adrenal axis response during acute endotoxemia. *Neuroimmunomodulation* 6: 336-343.
37. So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. (2007) Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 3: e94.
38. Phuc LP, Friedman JR, Schug J, Brestelli JE, Parker JB et al. (2005) Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLoS Genet* 1: e16.
39. Zhang X, Darnell JE, Jr. (2001) Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem* 276: 33576-33581.
40. Latchoumanin O, Mynard V, Devin-Leclerc J, Dugue MA, Bertagna X et al. (2007) Reversal of glucocorticoids-dependent proopiomelanocortin gene inhibition by leukemia inhibitory factor. *Endocrinology* 148: 422-432.

41. Lerner L, Henriksen MA, Zhang X, Darnell JE, Jr. (2003) STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* 17: 2564-2577.
42. Gagner J-P, Drouin J. (1985) Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol Cell Endocrinol* 40: 25-32.
43. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15623-15628.
44. Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 10: 1845-1864.
45. Uhlar CM, Whitehead AS. (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 265: 501-523.
46. Haller O, Staeheli P, Kochs G. (2007) Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89: 812-818.
47. Mashimo T, Glaser P, Lucas M, Simon-Chazottes D, Ceccaldi PE et al. (2003) Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2',5'-oligoadenylate synthetases. *Genomics* 82: 537-552.
48. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ et al. (2007) Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 18: 407-413.
49. Nelson AL, Barasch JM, Bunte RM, Weiser JN. (2005) Bacterial colonization of nasal mucosa induces expression of siderocalin, an iron-sequestering component of innate immunity. *Cell Microbiol* 7: 1404-1417.
50. 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.
51. Roth FP, Hughes JD, Estep PW, Church GM. (1998) Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat Biotechnol* 16: 939-945.



52. Hertz GZ, Stormo GD. (1999) Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* 15: 563-577.
53. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. (2004) WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res* 14: 1188-1190.

### 3.10. Figure Legends

#### Figure 3.1. Targets of LIF/STAT3 action.

**A)** The time course of STAT3 activation (phospho- STAT3) was determined in AtT-20 cells following treatment with LIF (10 ng/ml). Western blot analysis of P-STAT3 is compared to total STAT3 protein. **B)** Time course of STAT3 occupancy on the promoter of known STAT3 target genes determined by ChIP and QPCR. **C)** Chromosomal distribution of genomic binding sites for STAT3 determined by ChIP-chip analysis of LIF-treated (20 min) AtT-20 cells. Triplicate ChIP samples were analyzed on Affymetrix Mouse Tiling 2.0R Array Sets. Raw data were extracted with GCOS software (Affymetrix) and were analyzed using the MAT software package. STAT3 enrichment peaks were selected on the basis of a  $P$  value threshold of  $10^{-5}$ . Redundant sequence filtering led to the removal of 74 sequences, thus yielding a final count of 3 449 STAT3 binding sites. The list of these sites is presented in Table S1. The tiling array results were validated by QPCR analysis of independent ChIPs for 42 loci distributed randomly throughout all chromosomes; all 42 were confirmed. The same loci were used for further studies in Figure 3. FDR, calculated false discovery rate.

#### Figure 3.2. STAT3 genomic binding sites.

**A)** Distances between STAT3 binding peaks determined by whole-genome ChIP-chip and nearest known genes (UCSC mm7 mouse genome assembly). Depending on position relative to the closest gene, data were computed as upstream to nearest TSS (left), relative to the TSS within the body of the gene itself (middle) or relative to the 3' end of the gene (right). STAT3 binding sites that are outside these three categories were for the most part intergenic and this group constitutes 21.6% of the total number of STAT3 binding sites identified. **B)** Affymetrix Integrated Genome Browser (IGB) representation of tiling array data for STAT3 recruitment at the *Pomc* locus. In the top diagram, each vertical line represents the MAT score for one 25 bp oligonucleotide probe; each probe is spaced by 10 bp. The green solid horizontal bar indicates the interval of statistically significant ( $P \leq 10^{-5}$ ) STAT3 recruitment. This region contains a documented STAT3 binding site at -387/-379

bp [8,9]. **C)** STAT3 binding sites within the *Stat3/Stat5* locus. The upstream region of the *Stat3* gene was previously shown to contain an auto-regulatory STAT3 binding site at position -338/-331 bp [26]. Strong recruitment of STAT3 was observed in this region but also at other positions within the *Stat3/Stat5* locus. Statistically significant peaks ( $P \leq 10^{-5}$ ) of STAT3 binding are marked by the green boxes under the data diagram for tiling microarray data. **D)** Multiple STAT3 binding sites in the *Socs3* locus including an upstream site that correlates with the previously documented site at -72/-62 bp [27]. **E)** STAT3 binding sites flanking a microRNA gene, *miR-21*. The STAT3 binding peak at -2 801 bp is located near a STAT3 binding site previously identified in human [28]. **F)** WebLogo representation of known and computed preferred binding site for STAT3. The STAT3 binding site used by the MatBase database (Genomatix) for *in silico* analysis is shown together with a binding site derived from analysis of the 24 published sequences for STAT3 binding. All STAT3 binding regions from the tiling analysis were used to search for redundant DNA motifs, using non-biased algorithms: Consensus and AlignAce. As shown, both algorithms identified similar motifs. No other motif was identified within this dataset.

**Figure 3.3. Potentiation of STAT3 and GR recruitment at a subset of LIF/STAT3 target genes.**

**A)** A group of 32 genomic STAT3 target sites and 3 control (ctl) loci (*Gapdh*, *Myod* and *Tbp*) were evaluated for STAT3 binding by QPCR analysis of ChIP performed on AtT-20 cells treated for 20 minutes with LIF (10 ng/ml), Dex ( $10^{-7}$  M), both or vehicle. Following analysis, genes were re-grouped for presentation in three classes: those for which STAT3 recruitment is greater ( $\geq 1.25$  fold) in LIF+Dex than LIF-treated cells and those for which this is equal or smaller. **B)** GR ChIP performed on the same loci as for STAT3. **C)** Sequential ChIPs were performed for three loci on chromatin isolated from AtT-20 cells treated with LIF and Dex to confirm co-occupancy of STAT3 and GR on the same DNA fragments. Data are shown for single ChIP and for samples immunoprecipitated first with STAT3 and then GR antibody, and the reverse. In each case, data is presented as fold recruitment relative to the IgG sample and normalized by *Gapdh* as QPCR reference.

**Figure 3.4. Identification of LIF and glucocorticoid regulated genes.**

**A)** AtT-20 cells were treated with LIF, Dex, both or vehicle and total RNA was extracted from cells after 3h and 18h of treatment. Affymetrix MOE expression arrays were used to assess expression levels for 45101 probesets in each condition. The expression profiling data were normalized with the GC-RMA algorithm and statistical analysis was measured by Local-pooled-error test (LPE). The replicate variance is  $<0.001$ . Changes in gene expression levels in hormone-treated relative to control greater than 2-fold and for  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant. A total of 2396 probesets were thus identified, including all treatment conditions (Table S2). The bar histogram represents the number of probesets found to be up or down regulated in each condition. **B)** Bar diagram representing the number of probesets responding to treatment at either or both time points, for each condition. **C-D)** Venn diagram showing the overlap of probesets regulated by LIF, Dex or the combination at 3h and 18h of treatment. A large number of probesets were found to be uniquely regulated by both agents. **E)** Percentage of hormone regulated genes (probesets) that have at least one STAT3 binding site in the interval between 5 or 50 kb upstream or downstream of the gene. The random expectation value is calculated on all the genes present on the Affymetrix MOE 2.0 microarray.

**Figure 3.5. Clustering analysis of LIF and Dex regulated genes.**

**A)** Heat map representation of gene clustering identified by global analysis of the expression profiling dataset. The clustering was performed with GeneSpring GX 7.3 using Smooth correlation. **B)** Box plot representation of Smooth correlation K-means clustering of hormone regulated genes. The analyses required a minimum of 9 clusters in order to represent the different subgroups of genes that were found to be significantly associated. The list of genes in each cluster is presented in Table S3. **C)** Gene Ontology distribution of genes from cluster #7 that are repressed by Gc at 18h of treatment, irrespective of the presence of LIF; these genes are highly enriched ( $P \leq 10^{-14}$ - $10^{-11}$ ) in cell cycle and mitosis associated functions. The GO gene lists are presented in Table S4. **D)** Gene Ontology

distribution of cluster #2 genes that are upregulated by the joint action of LIF and Dex at 18h of treatment. These genes are implicated ( $P \leq 10^{-10}$ - $10^{-4}$ ) in cell defense response processes (Table S4). Gene Ontology analyses were made using the DAVID web site [32]. **E)** RT-QPCR analysis of randomly selected cluster #2 genes in AtT-20 cells treated with LIF+Dex in presence (LD+CHX) or absence (LD) of the protein synthesis inhibitor cycloheximide. These genes thus exhibit a secondary protein synthesis-dependent delayed response.

**Figure 3.6. Highly synergistic activation of the lipocalin 2 (*Lcn2*) gene by LIF and glucocorticoids.**

**A)** RT-QPCR analysis of *Lcn2* mRNA in AtT-20 cells treated with LIF, Dex or both. Note that the relative mRNA levels are presented on a logarithmic scale. Activation levels relative to control cells are: LIF (23-fold), Dex (10 278-fold) and LIF+Dex (156 026-fold). **B)** Western blot analysis of *Lcn2* induction in AtT-20 cells treated for various times with LIF and Dex as indicated. P-STAT3 levels were visualized by Western blot of whole cell extracts (top panel) whereas secreted *Lcn2* was revealed by analysis of culture medium. *Lcn2* protein was undetectable in WCE (data not shown). **C)** Bar representation of STAT3 ChIP-chip data for the *Lcn2* locus from the mouse whole-genome tiling array. The only significant STAT3 recruitment in the vicinity of the *Lcn2* gene was observed in an intergenic region located 22 kb upstream of the *Lcn2* gene (red arrow). **D)** The STAT3 binding region (1133 bp) of the *Lcn2* locus was cloned upstream of the minimal *Pomc* promoter and assessed for transcriptional activity by transfection into AtT-20 cells. **E)** The same reporters were assessed for responsiveness to LIF, Dex and LIF+Dex, as indicated. Only *Lcn2* enhancer-containing reporter exhibited hormone responsiveness. Data are presented as means  $\pm$  s.e.m. of three experiments, each performed in duplicates.

**Figure 3.7. *In vivo* regulation of LIF and glucocorticoids dependent genes.**

**A)** *Lcn2* serum levels were measured in mice following injection of LIF (100  $\mu$ g/kg), Dex (400  $\mu$ g/kg), or both intraperitoneally at 3h and 20h post-treatment. The 20h group of mice

received 5 injections of LIF and/or Dex respectively, in order to maintain hormone plasma levels. A group of mice were also injected with LPS (100 µg/kg) as positive control. Serum *Lcn2* revealed by Western blot is shown for 2 mice in each group. **B)** Pituitary *Lcn2* mRNA levels were measured by RT-QPCR at 3h post-treatment in mice treated with vehicle (C), LIF (L), Dex (D), LIF+Dex (LD) or LPS, as indicated. **C)** Pituitary *Lcn2* mRNA levels at 20h post-treatment. Note different scale relative to B. **D)** Liver *Lcn2* mRNA levels assessed by RT-QPCR at 3h post-treatment. **E)** Liver *Lcn2* mRNA at 20h post-treatment. **F)** Genes from cluster #2 implicated in cell defense mechanisms (GO analysis) were randomly picked and the relative abundance of their mRNA was assessed by RT-QPCR in pituitary, liver, testis, lung and heart of mice 20h after injection of vehicle (PBS), LIF+Dex (LD) or LPS. **G)** LIF and IL6 receptor mRNA levels relative to β-Actin mRNA as measured by RT-QPCR in untreated AtT-20, 10T½ and NIH 3T3 cells. **H)** Synergistic activation of *Lcn2* and three cluster #2 genes by LIF+Dex and IL6+Dex treatment in AtT-20, 10T½ and NIH 3T3 cells.

**Figure 3.S1.:** List of 91 genes from cluster #2 with known/suspected cell defense function.

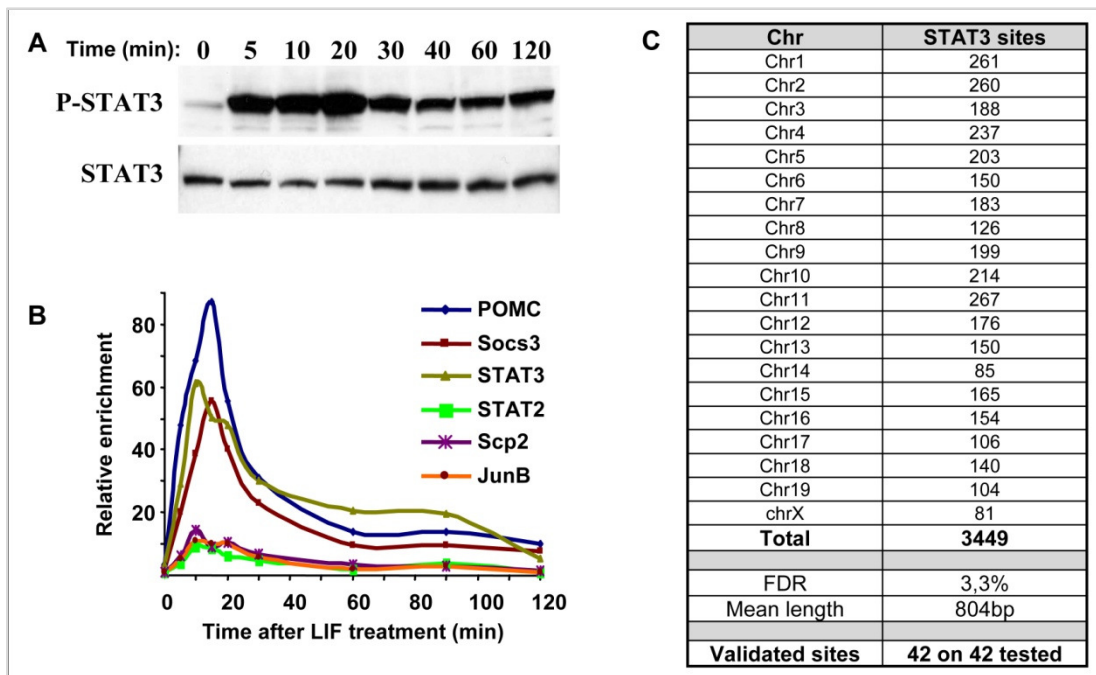
**Table 3.S1.:** List of genomic STAT3 binding regions selected for a *P* value threshold of  $10^{-5}$  after analysis with MAT algorithm (Mouse mm7 assembly).

**Table 3.S2.:** List of LIF and/or glucocorticoid regulated genes.

**Table 3.S3.:** List of gene annotations attributed by DAVID web site for each cluster.

**Table 3.S4.:** Gene Ontology analyses of the 9 gene clusters.

*Note: Les tables 3.S1 à 3.S4 représentent des tableaux imposants en format excel, donc ils sont disponibles sur le site internet de PLoS Genetics. De même, les données brutes des puces d'expression ont été déposées sur le site internet NCBI GEO sous le numéro GSE19042.*



**Figure 3.1. Targets of LIF/STAT3 action.**

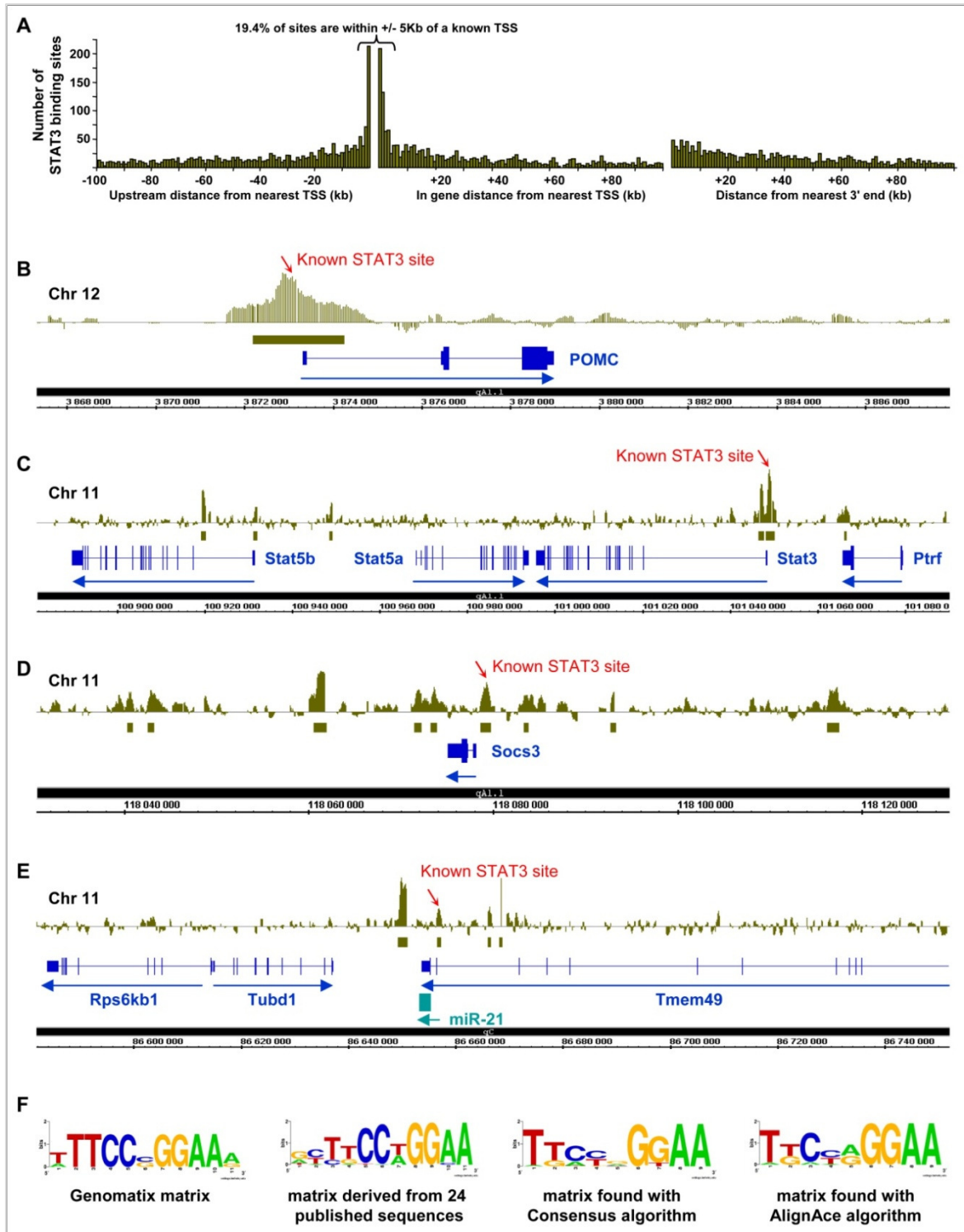
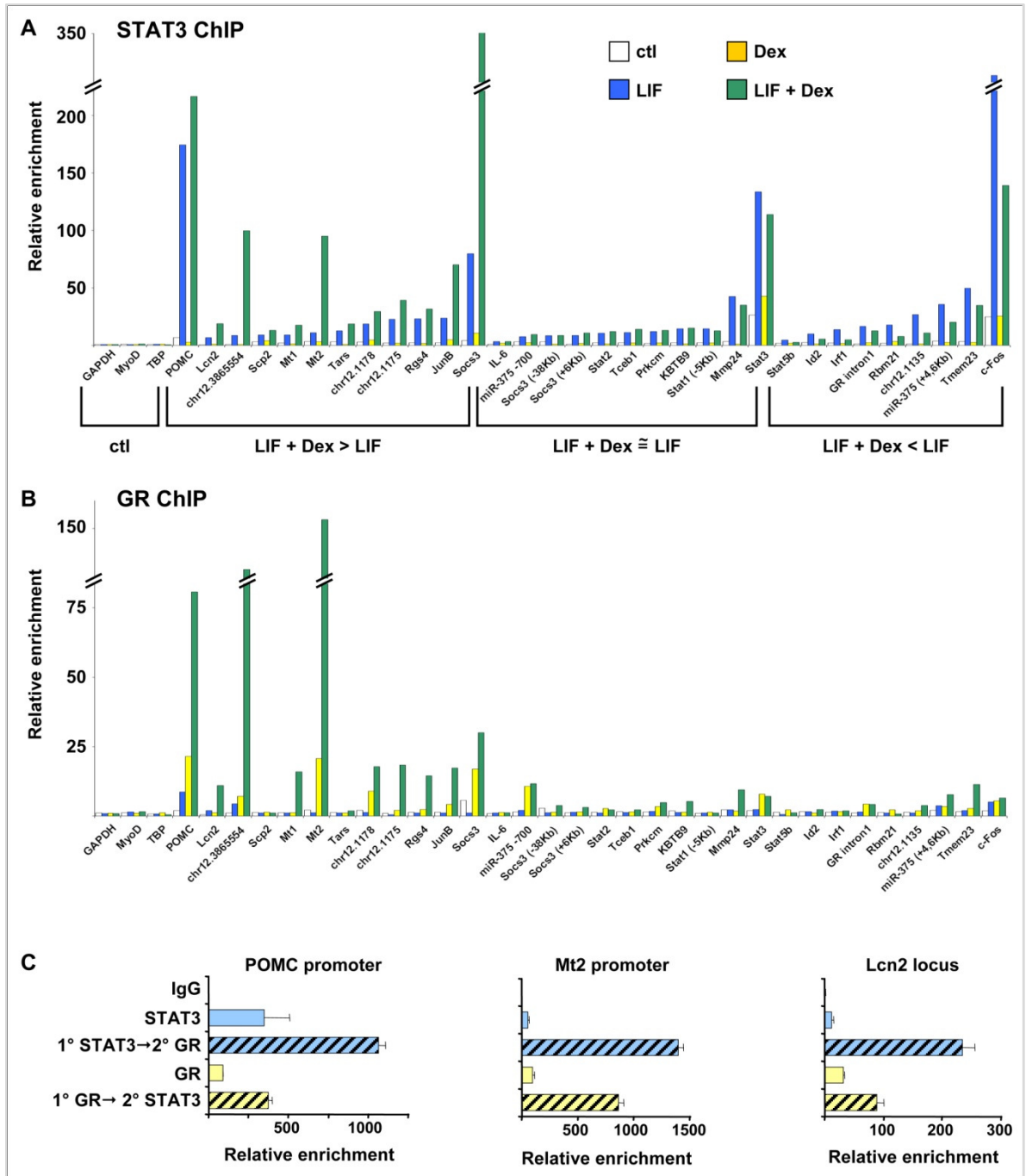


Figure 3.2. STAT3 genomic binding sites.





**Figure 3.3. Potentiation of STAT3 and GR recruitment at a subset of LIF/STAT3 target genes.**

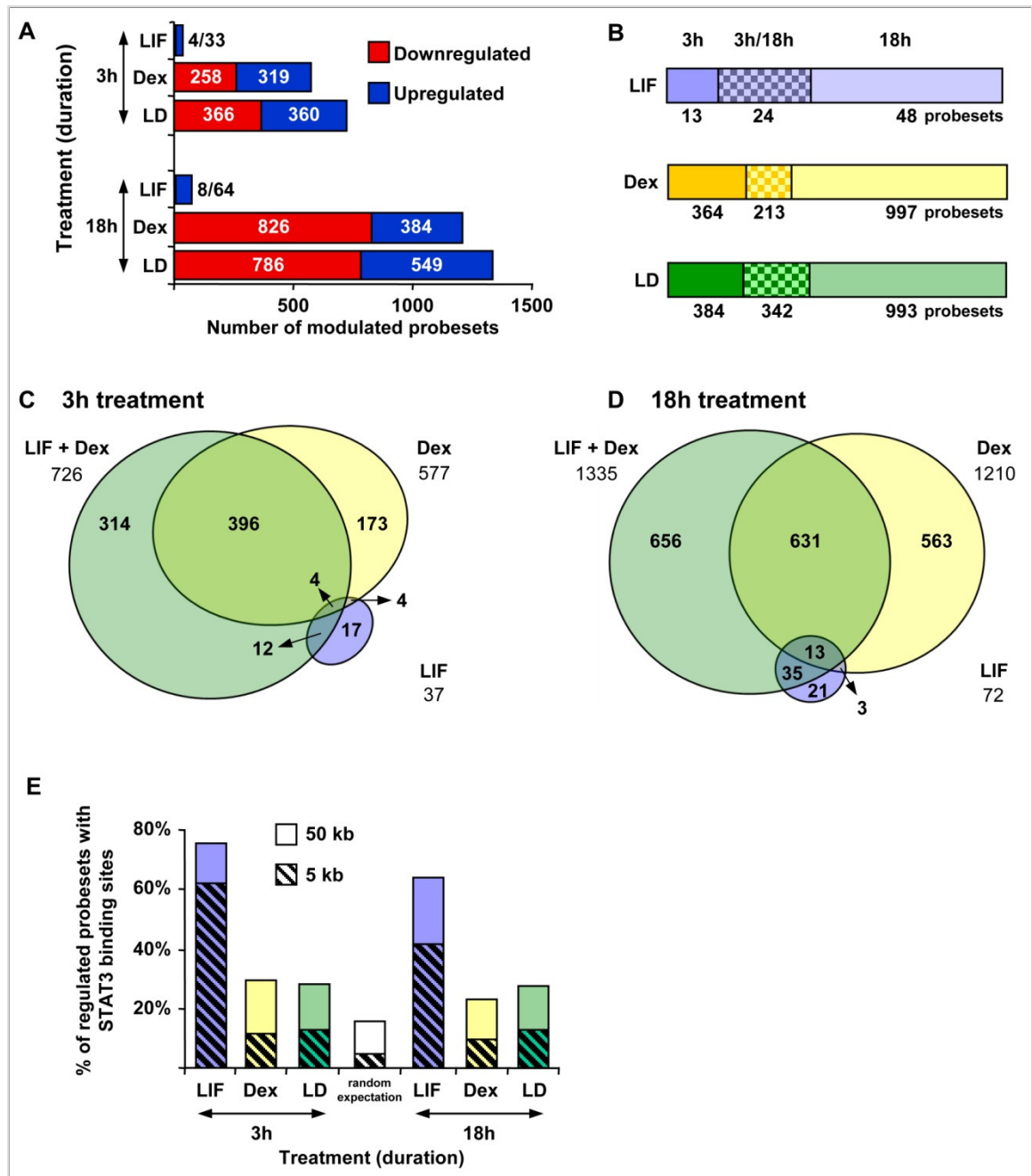


Figure 3.4. Identification of LIF and glucocorticoids regulated genes.

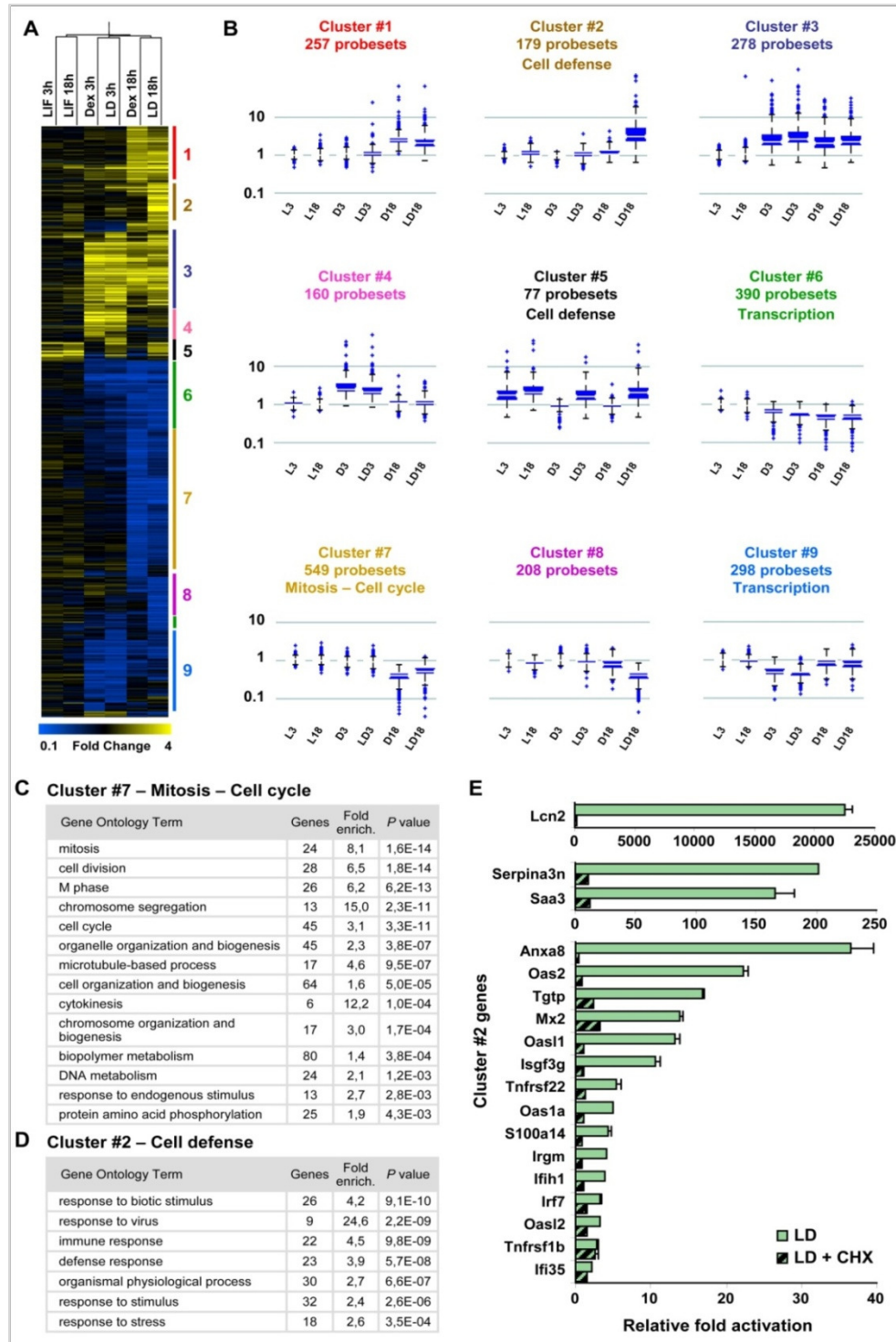
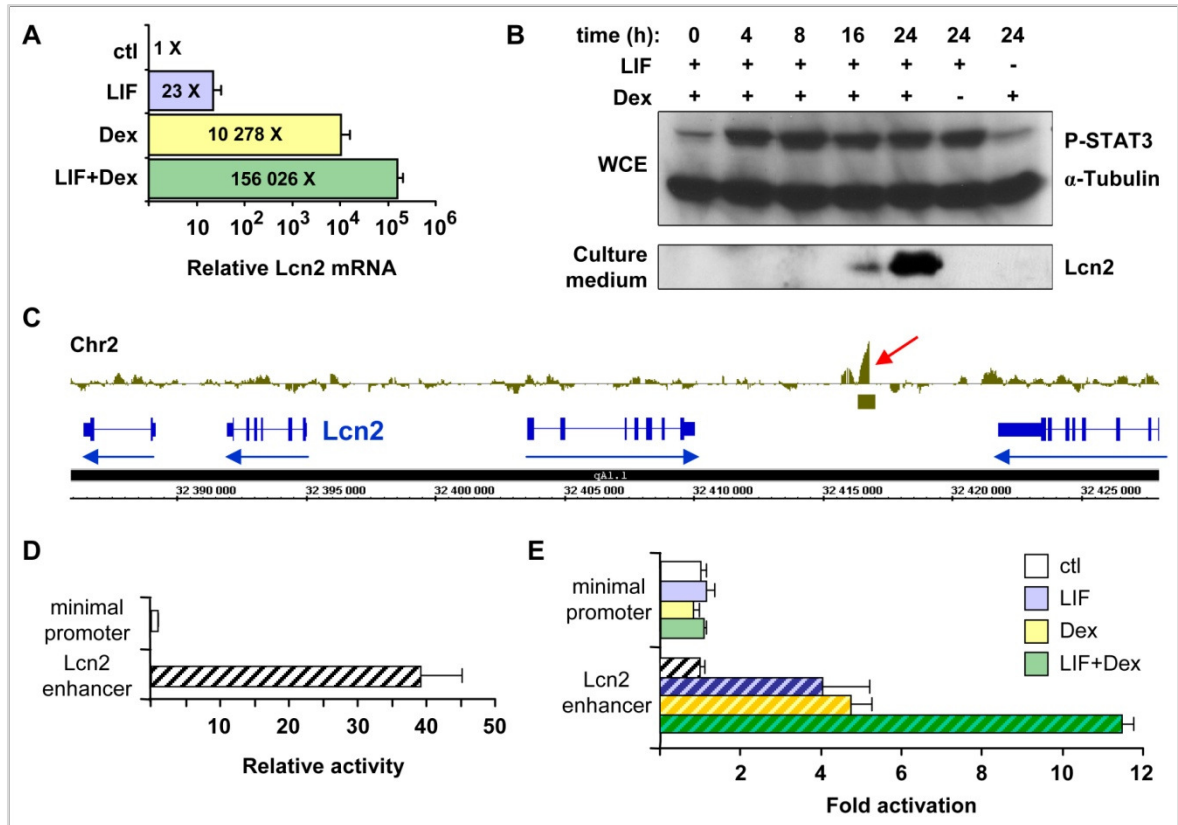
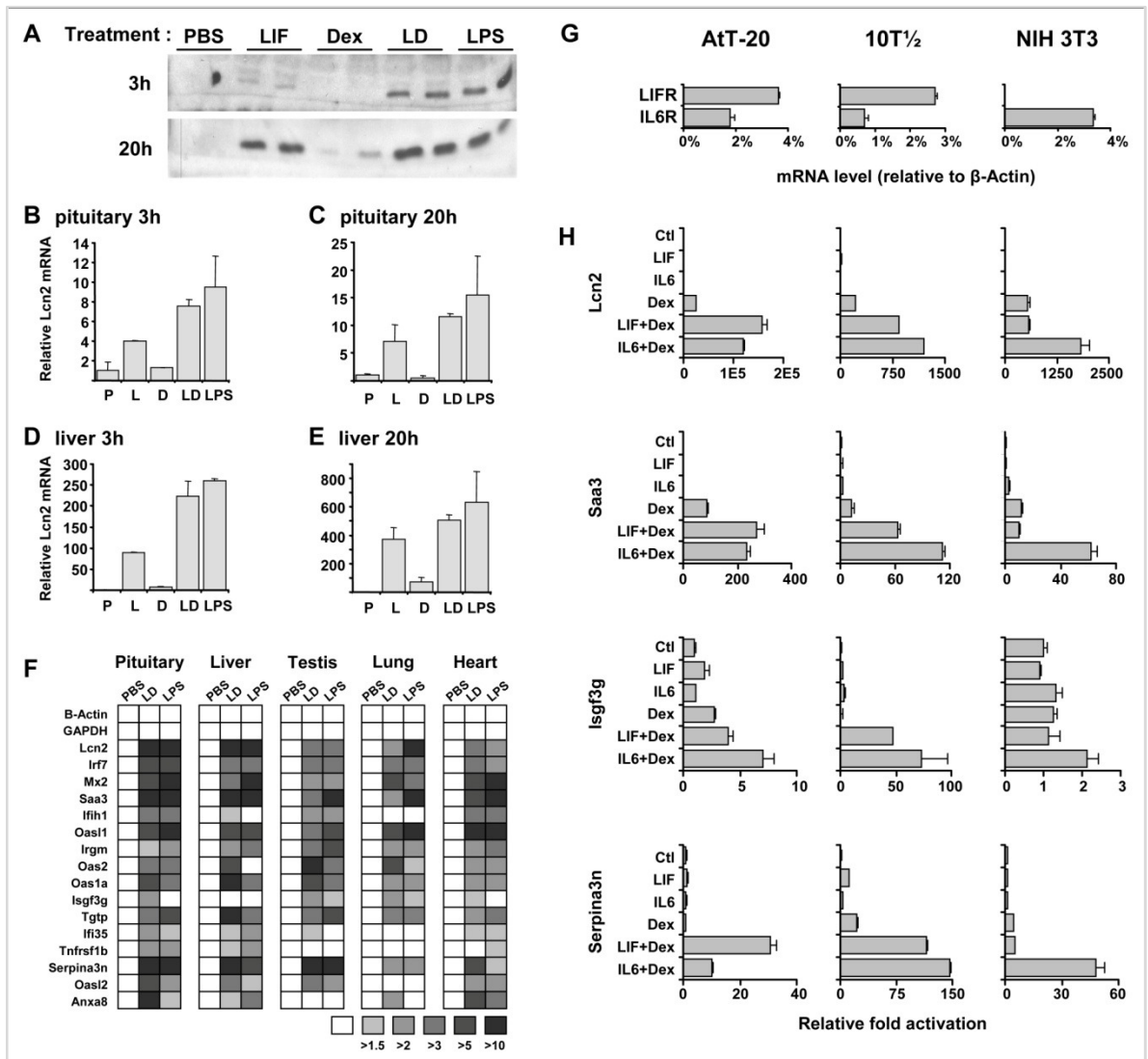


Figure 3.5. Clustering analysis of LIF and Dex regulated genes.



**Figure 3.6. Highly synergistic activation of the lipocalin 2 (*Lcn2*) gene by LIF and glucocorticoids.**



**Figure 3.S1: List of 91 genes from cluster #2 with known/suspected cell defense function.**

GeneID	Affy probeset	GeneName	GeneSymbol
NM_145211	1424775_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 1a	Oas1a
NM_001083925	1425119_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 1b	Oas1b
NM_145227	1425065_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	Oas2
NM_145226	1425374_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 3	Oas3
NM_145209	1424339_at	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	Oas1l
NM_011854	1453196_a_at	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	Oas12
NM_007403	1416871_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 8	Adam8
NM_008032	1443963_at	af4/fmr2 family, member 2	Aff2
NM_007447	1438936_s_at	angiogenin, ribonuclease a family, member 1	Ang
NM_013473	1417732_at, 1425789_s_at	annexin a8	Anxa8
NM_009711	1432032_a_at	artemin	Artn
NM_009735	1452428_a_at	beta-2 microglobulin	B2m
NM_183162	1435454_a_at	cdna sequence bc006779	BC006779
NM_153576	1451610_at	cdna sequence bc024561	Vcc1
NM_001033419	1441120_at	cea-related cell adhesion molecule 16	Ceacam16
NM_170684	1433715_at	copine vii	Cpne7
NM_172689	1436562_at	dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 58	Dxd58
NM_010050	1418938_at, 1426081_a_at	deiodinase, iodothyronine, type ii	Dio2
NM_001013371	1435208_at, 1439825_at	deltex 3-like (drosophila)	Dtx3l
NM_194067	1454757_s_at	dna segment, chr 12, erato doi 647, expressed	ISG12a
NM_011163	1422005_at, 1422006_at	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	Eif2ak2 (PKR)
NM_134151	1433775_at	expressed sequence c77080	Yars
NM_017370	1448881_at	haptoglobin	Hp
NM_008326	1418825_at	immunity-related gtpase family, m	Irgm
NM_008394	1421322_a_at	interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma	Irf9
NM_018738	1417141_at	interferon gamma induced gtpase	Igtp
NM_026820	1424254_at	interferon induced transmembrane protein 1	Ifitm1
NM_025378	1423754_at	interferon induced transmembrane protein 3	Ifitm3
NM_027835	1426276_at	interferon induced with helicase c domain 1	Iflh1
NM_019440	1417793_at	interferon inducible gtpase 2	Ilgp2
NM_016850	1417244_a_at	interferon regulatory factor 7	Irf7
XM_001471685	1431591_s_at	interferon, alpha-inducible protein	Isg15
NM_027320	1424617_at, 1459151_x_at	interferon-induced protein 35	Ilf35
NM_172161	1436507_at	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	Irak2
NM_013571	1419823_s_at	kinase suppressor of ras 1	Ksr1
NM_023125	1416676_at, 1426045_at	kininogen 1	Kng1
NM_010708	1421217_a_at	lectin, galactose binding, soluble 9	Lgals9
NM_011175	1448883_at	legumain	Lgmn
NM_178665	1436714_at	lim domain containing preferred translocation partner in lipoma	Lpp
NM_023463	1422749_at	lymphocyte antigen 6 complex, locus g6c	Ly6g6c
NM_010693	1425396_a_at	lymphocyte protein tyrosine kinase	Lck
NM_080638	1448618_at, 1456586_x_at	major vault protein	Mvp
NM_007746	1419208_at	mitogen activated protein kinase kinase kinase 8	Map3k8
NM_139300	1425506_at	myosin, light polypeptide kinase	Mylk
NM_010846	1451905_a_at	myxovirus (influenza virus) resistance 1	Mx1
NM_013606	1419676_at	myxovirus (influenza virus) resistance 2	Mx2
NM_026012	1429127_at	neurotrophin receptor associated death domain	Nradd
NM_019401	1425719_a_at	n-mcy (and stat) interactor	Nmi
NM_133249	1449945_at	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	Ppargc1b
NM_008876	1457252_x_at	phospholipase d2	Pld2
NM_008872	1415806_at	plasminogen activator, tissue	Plat
NM_011113	1452521_a_at	plasminogen activator, urokinase receptor	Plaur
XM_001476537	1452178_at	plectin 1	Parp10
NM_027514	1423903_at, 1423904_a_at, 1451160_s_at, 1423905_at	poliovirus receptor	Pvr
NM_145619	1426210_x_at, 1445888_x_at	poly (adp-ribose) polymerase family, member 3	Parp3

NM_030253	1416897_at	poly (adp-ribose) polymerase family, member 9	Parp9
NM_010610	1425987_a_at	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily m, alpha member 1	Kcnma1
NM_021384	1421008_at, 1421009_at, 1436058_at	radical s-adenosyl methionine domain containing 2	Rsad2
NM_023386	1418580_at	receptor transporter protein 4	Rtp4
NM_029821	1431786_s_at, 1455186_a_at	riken cdna 1190003j15 gene	1190003J15Rik
NM_001039530	1451564_at	riken cdna 1600029o10 gene	Parp14
NM_001081156	1453008_at	riken cdna 2300002d11 gene	2300002D11Rik
XM_911308	1424518_at	riken cdna 2310016f22 gene	Apol9a
NM_023680	1422038_a_at, 1426095_a_at, 1442590_at	riken cdna 2810028k06 gene	Tnfrsf22
NM_030150	1420768_a_at, 1451426_at	riken cdna b430001i08 gene	Dhx58
NM_025393	1449166_at	s100 calcium binding protein a14	S100a14
NM_026416	1425560_a_at	s100 calcium binding protein a16	S100a16
NM_011311	1424542_at	s100 calcium binding protein a4	S100a4
NM_011414	1448377_at	secretory leukocyte peptidase inhibitor	Slpi
NM_009252	1419100_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade a, member 3n	Serpina3n
NM_011315	1450826_a_at	serum amyloid a 3	Saa3
NM_009283	1450033_a_at, 1450034_at	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1
NM_133221	1417811_at	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6	Slc24a6
NM_009579	1422786_at, 1436164_at	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	Slc30a1
NM_001042592	1426818_at	sterol o-acyltransferase 1	Arrdc4
NM_146064	1460722_at	sterol o-acyltransferase 2	Soat2
NM_011519	1415944_at, 1448158_at	syndecan 1	Sdc1
NM_009318	1421812_at, 1450378_at	tap binding protein	Tapbp
NM_011579	1449009_at	t-cell specific gtpase	Tgtp
NM_023141	1421998_at, 1450454_at	torsin family 3, member a	Tor3a
NM_015799	1425381_a_at	transferrin receptor 2	Trfr2
NM_013683	1416016_at	transporter 1, atp-binding cassette, sub-family b (mdr/tap)	Tap1
NM_009277	1418077_at, 1448940_at	tripartite motif protein 21	Trim21
NM_009546	1426415_a_at	tripartite motif protein 25	Trim25
NM_021885	1420925_at	tubby candidate gene	Tub
NM_011610	1448951_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	Tnfrsf1b
NM_009396	1438855_x_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2
NM_030711	1416942_at	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	Arts1
NM_019392	1425248_a_at, 1425249_a_at	tyro3 protein tyrosine kinase 3	Tyro3
NM_021394	1419604_at, 1429947_a_at	z-dna binding protein 1	Zbp1
NM_011777	1417240_at	zyxin	Zyx

# **Chapitre 4: The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome**

**Running Title: Stat3/GR interaction code**

David Langlais<sup>1,2</sup>, Catherine Couture<sup>1</sup>, Jacques Drouin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Montréal QC, Canada, H2W 1R7

and

<sup>2</sup>Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal

Montréal QC, Canada, H3C 3J7

**\*Corresponding author :** Jacques Drouin  
Molecular Genetics Laboratory  
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110, avenue des Pins Ouest  
Montréal QC H2W 1R7 Canada  
Tel.: (514) 987-5579; Fax: (514) 987-5575



## 4.1. Avant-propos

### 4.1.1. Publication

Cet article a été soumis et est en processus de révision par les pairs à Molecular Cell.

### 4.1.2. Contribution des auteurs

J'ai conçu et effectué la majorité des expériences qui ont mené à cette publication. Également, j'ai effectué la totalité des nombreuses analyses bioinformatiques qui étaient requises pour cette étude génomique. Catherine Couture m'a supporté dans l'établissement des lignées cellulaires stables et dans les nombreuses ChIP et QPCR qui forment les figures 4.4 et 4.6A. De plus, elle a effectué les ChIP et QPCR sur les cellules transfectées avec les siRNA contre GR (Figure 4.6B). Nous avons également collaborer dans le clonage et la transfection des rapporteurs luciférases contenant les éléments de réponse à Stat et GR (Figure 4.5C).

### 4.1.3. Contexte

La production des Gc comme résultante de l'activation de l'axe HPA, exerce une action anti-inflammatoire, en plus de favoriser certaine voies de la réponse immunitaire, l'*acute phase response* et la réponse innée de défense cellulaire (tel que décrite au chapitre précédent). Afin de tenter de conjuguer des effets qui semblent à première vue dissociés, nous avons entrepris d'investiguer les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activation des voies Gc et des cytokines pro-inflammatoires LIF/IL6.

Depuis un peu plus de vingt ans, il est connu que GR peut agir selon deux modes d'action principaux: 1) la liaison directe de l'ADN sur des éléments GRE, 2) son recrutement indépendant de l'ADN par contact protéine:protéine (*tethering*) avec d'autres facteurs de transcription. Bien que quelques exemples précis de *tethering* aient été bien

décrit dans la littérature, son importance au niveau génomique demeure inexploré. Grâce à une technologie récente de séquençage à haut débit de CHIP, nous avons analysé les sites de liaison génomique de Stat3 et de GR en réponse à leur signaux respectifs (LIF ou Gc) ou à leur combinaison.

L'analyse combinatoire des 5670 régions recrutant Stat3 et/ou GR nous a permis d'identifier différents schémas de liaison. Nous savions depuis l'étude du chapitre précédent que Stat3 lie beaucoup de sites génomiques en réponse à LIF, mais que peu d'entre eux semblent actifs transcriptionnellement. Par contre, les gènes activés par une stimulation LIF arborent souvent plusieurs sites Stat3 à proximité. Le recrutement de GR à l'ADN en réponse à Dex induit presque exclusivement l'activation des gènes cibles, confirmant que l'action répressive de GR via des nGRE semble marginale. De façon plus intéressante, le co-recrutement de Stat3 et de GR à l'ADN induit une synergie de recrutement, mais aussi une synergie transcriptionnelle. Malgré que nous ayons identifié un site de liaison composite pour Stat3 et GR (le SGRE, *Stat and GR response element*), l'effet synergique de leur co-recrutement n'est pas dépendant d'un agencement particulier. Outre ces effets médiés par le recrutement de ces facteurs à l'ADN, nous avons également découvert et prouvé le recrutement réciproque de GR et Stat3 par *tethering*, et ce sur des centaines de sites. Cette interaction privilégiée n'a de réciproque que le recrutement, puisque l'effet transcriptionnel qui en découle ne l'est pas. Ainsi, le *tethering* de GR sur Stat3 résulte en une transrépression de l'activation LIF, tandis que le *tethering* de Stat3 sur GR engendre plutôt une synergie entre les voies LIF et Gc. Les résultats du présent chapitre illustrent les différentes méthodes qu'utilisent LIF/Stat3 et GR/Gc pour s'influencer et démontrent bien que le *tethering* est un mécanisme important et très répandu dans le contrôle de la transcription.

## 4.2. Summary

Transcription factor recruitment to genomic sites of action is primarily due to direct protein:DNA interactions. The subsequent recruitment of co-regulatory complexes leads to either transcriptional activation or repression. In contrast to this canonical scheme, some transcription factors such as the glucocorticoid receptor (GR) behave as transcriptional repressors when recruited to target genes through protein tethering. We have investigated the genome-wide prevalence of tethering between GR and Stat3 and found non-reciprocal interactions, namely that GR tethering to DNA-bound Stat3 results in transcriptional repression whereas Stat3 tethering to GR results in synergism. Further, other schemes of GR and Stat3 co-recruitment to regulatory modules result in transcriptional synergism, including neighbouring and composite binding sites. The results indicate extensive transcriptional interactions between Stat3 and GR; further, they provide a genome-wide assessment of transcriptional regulation by tethering and a molecular basis for integration of signals mediated by GR and Stats in health and disease.

### *Highlights*

- Extensive cooperative genomic recruitment of GR and Stat3
- Co-recruitment of GR and Stat3 to regulatory sequences results in transcriptional synergism
- Stat3 tethering to GR is associated with transcriptional synergism
- GR tethering to Stat3 is linked to trans-repression by GR

### 4.3. Introduction

The classical view of transcriptional activation relies on recruitment of transcription factors (TF) to a cognate DNA sequence, the regulatory element, that provides specificity of action (Lee and Young, 2000; Kadonaga, 2004). The protein:DNA interaction between TF and its cognate element is thus the premise for transcriptional action. The recruitment of DNA binding TFs is followed by formation of protein complexes that involve many co-regulatory factors, coactivators and corepressors, together with complexes involved in chromatin remodelling and looping between regulatory domains, promoters and enhancers (Kagey et al., 2010; Bulger and Groudine, 2011). The transcriptional action of TFs is thus modulated by their context of action including landscape of DNA regulatory sequences and coregulatory proteins expressed within a particular cell context. One particularly interesting and unresolved property is the ability of some activating TFs to behave as DNA binding activators when directly recruited to cognate DNA sequences and to behave as transcriptional repressors when recruited to target genes through protein:protein tethering rather than direct DNA interaction. Although the modalities of this mechanism of trans-repression have been defined (Oakley and Cidlowski, 2011), the prevalence and molecular basis for this dual action remains unclear.

The glucocorticoid (Gc) receptor (GR) provided the first (Yang-Yen et al., 1990; Jonat et al., 1990; Schule et al., 1990) and still best investigated example of these dual transcriptional properties. Indeed, GR activates transcription when recruited to target genes through direct DNA binding of GRE elements whereas its recruitment by tethering to DNA-bound TFs such as AP1 (Yang-Yen et al., 1990; Schule et al., 1990; Jonat et al., 1990), NF $\kappa$ B (Ray and Prefontaine, 1994), NGFI-B (Philips et al., 1997) leads to antagonism of transcription activated by those DNA-bound factors. These TFs mediate various inflammatory or acute phase responses, and Gc/GR antagonize many of these responses (Glass and Saijo, 2010). Also, many pro-inflammatory cytokines stimulate pathways that lead to activation of Stat TF (Schindler et al., 2007). At genome level, Gc/GR also act in synergy with pro-inflammatory signals to activate a subset of target

genes. Synergistic activation of transcription by Gc and Stats was shown for different Stats, including Stat1, Stat3 and Stat5 (Stocklin et al., 1996; Takeda et al., 1998; Aittomaki et al., 2000; Wyszomierski and Rosen, 2001). In some cases, the synergistic action of GR was suggested to be DNA-binding-independent, in agreement with a tethering model (Stoecklin et al., 1997; Lerner et al., 2003; Engblom et al., 2007). Although direct Stat-GR interactions were well documented, the tethering of these TF at genomic sites was never demonstrated.

Biological stresses activate the classical stress response and their mediator Gc, as well as the inflammatory response mediated by cytokines. In particular, activation of Stat3 in response to cytokines like IL-6 is observed in many disease conditions such as in metabolic syndrome (Wang, 2005; Vegiopoulos and Herzig, 2007; Grundy et al., 2005) and cancer (Yu and Jove, 2004). We have investigated the genome-wide interactions between Gc and the cytokines LIF/IL6, and identified downstream gene networks that are regulated by cross-talk between GR and Stat3 (Langlais et al., 2008). This work identified a large number of genomic targets of Stat3 recruitment, in striking contrast to the relatively small number of genes that are regulated by this factor. However, the work showed that Stat3 is required to allow Gc/GR regulation of a much larger set of target genes and suggested a cooperative binding model for a gene subset. The present work investigated the molecular basis for transcriptional regulation by GR and Stat3 at genome level. Transcriptional synergism between these factors is shown to rely on interactions between the factors bound to DNA in a variety of modalities but also when their association is mediated through protein:protein tethering. Interestingly, whereas recruitment of Stat3 to GR through protein interactions or their co-recruitment to neighbouring sites results in transcriptional synergism, the reverse, namely recruitment of GR to DNA-bound Stat3, is associated with trans-repression or transcriptional antagonism. The present work thus defines the genome-wide interaction code between Stat3 and GR, and its transcriptional outcome. Further, it provides a molecular basis to integrate the actions of these pathways in health and disease.

## 4.4. Results

In order to investigate the complex interactions between Stat3 and GR binding to DNA, we performed ChIP-seq analysis of Stat3 and GR binding in AtT-20 cells. The cells were either stimulated by LIF to activate Stat3, by Dexamethasone (Dex) to activate GR or both. The ChIP-seq experiments yielded 29 to 66 independent million sequence reads (Table S1). Peaks representing genomic recruitment of Stat3 or GR were identified with the MACS algorithm using a high confidence threshold p value of  $\leq 10^{-8}$  (Zhang et al., 2008). The combined ChIP-seq data from hormone-treated cells identified 5 670 peaks of unique chromosomal localization. For each peak, sequence read densities were extracted over a 2 kb region surrounding the peak and these data were used for clustering analyses (Fig. 1A). The ChIP-seq revealed a large number of Stat3 genomic binding sites in agreement with our previous whole-genome ChIP-chip analyses (Langlais et al., 2008). Clustering analysis of Stat3 and GR peaks yielded eight major clusters that define prototypic binding schemes (Fig. 1B).

### 4.4.1. Independent genome recruitment of Stat3 and GR

The bulk of Stat3 binding is independent of Gc/GR. Indeed, the large cluster 3 (2 465 peaks) exhibits LIF-dependent Stat3 binding of similar magnitude with/without Dex treatment. The search for Stat3 binding element (SBE) around these peaks identified a SBE site at high frequency close to peak center (Fig. 1C and S1A, B). Clusters 1 and 2 also exhibited Stat3 recruitment without GR recruitment and a high frequency of SBE at peak center; however, the level of Stat3 recruitment in these clusters is influenced by Dex treatment (without evidence of direct GR binding). None of cluster 1, 2 and 3 sequences revealed GR response elements (GRE) within the peak interval (Fig. 1C). Similarly, cluster 7 represents a group of Dex-dependent GR binding sites that are not influenced by LIF treatment (Fig. 1A, B). Motif analysis of cluster 7 sequences revealed GRE sequences at high frequency, but no enrichment of SBEs (Fig. 1C and S1A, B); similar results were obtained for cluster 8 peaks that exhibit less efficient GR recruitment.

One interesting cluster is comprised of chromosomal regions that exhibit independent binding of Stat3 and GR (cluster 5). For the 377 peaks that constitute cluster 5, Stat3 and GR binding peaks were within 200 pb of each other and in many cases, almost overlapping. Sequential ChIP analyses of a few cluster 5 peaks confirmed dual occupancy by both Stat3 and GR (Langlais et al., 2008). A stringent search for canonical SBE and GRE motifs within cluster 5 sequences identified such motifs in about 50% of loci (Fig. S1B). Localization of these motifs was performed relative to the Stat3 binding peak and this analysis identified SBEs at high frequency under the peak. GREs were also found at peak and surrounding positions (Fig. 1C). In addition to searches for the canonical SBE and GRE motifs, we performed *de novo* motif analyses within sequences of all clusters (Fig. S1A). Interestingly, these analyses revealed motifs highly related to SBE in clusters 1, 2, 3 and 5, and motifs related to GREs in clusters 7, 8 and 5 (Fig. S1A). The *de novo* search of motifs around peaks that do not have well-conserved SBEs nonetheless yielded sequences related to SBE, but more degenerate (Fig. S1D). No other *de novo* motif was found within any of these clusters at a statistically significant level. However, the search for known TF binding sites associated with Stat3-GR peaks revealed enrichment of motifs for Fox, bHLH, AP1, CREB and SP1 factors, but not for Hox, ZF POZ, LEF, Oct, Bicoid, GATA, Tbox, etc. motifs (Fig. S1E, F). The motifs that are enriched tend to correspond to signal-activated TFs and their association may reflect clustering at signal responsive regulatory sequences. In contrast, motifs for factors associated with developmental decisions or morphogen responsiveness are not enriched or even depleted around the Stat3-GR peaks.

#### **4.4.2. Stat3 and GR recruitment through protein tethering**

The binding properties of two clusters are suggestive of genomic recruitment through protein interactions. Sequences of cluster 4 recruit Stat3 in LIF-treated cells as well as in Dex+LIF (DL)-treated AtT-20 cells (Fig. 1A, B). In addition, sequences of this cluster also exhibit GR recruitment in DL-treated cells but not in Dex treatment alone (Fig. 1B). These binding properties suggest that GR recruitment may be mediated through Stat3 rather

than direct DNA binding: consistent with this interpretation, the search for SBE and GRE motifs only revealed SBEs at these peaks (Fig. 1C and S1B). These binding properties are consistent with prior report of direct Stat3 and GR interactions (Zhang et al., 1997). The sequences of cluster 6 reflect similar binding properties with GR as primary DNA binding factor. Indeed, GR is recruited to cluster 6 sequences in Dex and DL-treated cells whereas Stat3 is only recruited in DL-treated cells (Fig. 1B). Further, motif searches within sequences of cluster 6 primarily revealed GRE sequences with much less frequent association of SBE sites (Fig. 1C and S1B). These interpretations are supported by *de novo* motif searches within the clusters: the analyses only identified motif related to SBE in cluster 4 and to GRE in cluster 6 (Fig. S1A). The hypothesis that these peaks reflect recruitment of a second TF through tethering to a DNA-bound factor (Fig. 1D) is investigated below.

#### **4.4.3. Transcriptional activation by Stat3 or GR**

In order to correlate the binding properties of Stat3 and GR with hormone responsiveness, we plotted responses to various hormone treatments (Langlais et al., 2008) for genes (2396 genes are hormone responsive) associated (within 20 kb) with peaks in each cluster (Fig. 2). Cluster 3 represents the bulk of Stat3 peaks and the hormone response associated with this cluster is primarily upregulation in presence of LIF. A subset of these genes is also antagonized by Dex treatment. Consistent with this association, Stat3 binding peaks are located close to LIF upregulated genes (Fig. 3A and B). It is noteworthy that the number of Stat3 binding peaks is far greater than the number of LIF-upregulated genes as we reported previously (Langlais et al., 2008). The average height of Stat3 peaks associated with upregulated genes is statistically higher than other Stat3 peaks (Fig. S2A) despite the fact that SBE sequences identified in different groups of Stat3 peaks are not noticeably different. Dex upregulated genes are predominantly found within cluster 7 but also in clusters 6 and 5 (Fig. 2 and S3A). As for Stat3, GR binding peaks that are close to Dex upregulated genes (Fig. 3C and D) have greater peak heights than other GR peaks (Fig.



S2D). In contrast, there is no direct association of GR binding peaks with Dex downregulated genes (Fig. 3C and E, and S3B), as previously reported (Reddy et al., 2009). Hormone responsiveness of peaks from cluster 7 indicates that they are primarily associated with genes upregulated by Dex (Fig. 2). Some of these genes exhibit synergy in presence of DL or antagonism between the two pathways. The reasons for this dichotomy are not obvious or borne out by clustering analyses: it is however noteworthy that loci of most regulated genes contain peaks of different clusters as discussed below. Taken together, these data indicate that direct recruitment of Stat3 or GR is predominantly associated with activation of transcription but not with repression.

#### **4.4.4. GR antagonism of Stat3-dependent transcription**

The hormone responsiveness pattern of genes associated with cluster 4 is relatively simple, namely these genes are stimulated by LIF and antagonized by Dex; conversely, these genes are almost never subject to synergism (Fig. 2, cluster 4). This cluster is comprised of overlapping Stat3 and GR peaks, the latter being observed only in DL, but not Dex, conditions. These peaks are preferentially localized in 5' flanking sequences but not as close to transcription start sites (TSS) as peaks or motifs associated with other clusters (Fig. 3F). Genes/loci that have cluster 4 peaks and exhibit LIF-dependent transcription antagonized by Dex contain at least one cluster 4 peak but also in some cases, peaks corresponding to clusters 1, 2 or 3 but usually not clusters 5, 6 or 7 (Fig. 3G and S3C). In order to test the hypothesis that cluster 4 peaks represent recruitment of GR tethered to SBE-bound Stat3, we generated populations of AtT-20 cells stably expressing either Flag chimeras of GR or of a GR mutant deficient for DNA binding; the mutant GR used in these experiments contains two amino acid replacements within the GR DNA binding domain and these mutations were shown to prevent direct DNA binding but not protein:protein interactions (Stoecklin et al., 1997). Pools of AtT-20 cell clones expressing either GR wild-type or mutant were analyzed for expression of Flagged proteins by Western blots. These analyses showed that Flag-GR wild-type (Flag-GR) and mutant (Flag-GRm) were

expressed at similar levels and that these levels are comparable to those of endogenous GR (Fig.S4A and B). CHIP-QPCR for GR as well as for Flag-GR was performed at representative loci of each gene cluster (Fig. 4A). The ratio of recruitment at each locus for Flag-GRm was calculated relative to recruitment of Flag-GR. As expected, this ratio was close to null for peaks in clusters 7 and 6 that have canonical GREs and require GR binding (Fig. 4A). Peaks of cluster 5 maintained low but significant Flag-GRm binding and this is discussed below together with analyses of this cluster. In contrast, significant recruitment of Flag-GRm was retained for peaks of cluster 4. Taken collectively, the data clearly support the interpretation that peaks of cluster 4 associated with GR antagonism of Stat3 activation represent GR recruitment by DNA-independent tethering to DNA-bound Stat3. Since genes associated with cluster 4 peaks are subject to trans-repression by Gc, we assessed recruitment of co-repressors to these and other peaks in response to hormone treatment. These analyses did not show any Dex-dependent recruitment of the SMRT or NCoR co-repressors to cluster 4 peaks (Fig. S4E-G). Further, analysis of SBE motifs and their surrounding sequences at cluster 4 peaks associated with Gc trans-repressed genes did not reveal any sequence particularities compared to other SBEs.

#### **4.4.5. Synergism between Stat3 and GR**

The hormone response profiles (Fig. 2) indicate that peaks of cluster 5 are primarily associated with genes that exhibit synergistic responses to Dex and LIF. The hallmark of cluster 5 is the presence of relatively independent Stat3 and GR peaks (Fig. 1B, D). Various binding modalities could be associated with transcriptional synergism but a majority of cluster 5 loci exhibit slightly enhanced Stat3 binding in DL compared to LIF conditions (Fig. 1B, S2F and G). In order to address the modalities of interactions between Stat3 and GR at cluster 5 peaks, we investigated the relative positions of their binding motifs.

Both assessment of distance between SBE and GRE within cluster 5 peaks and the search for *de novo* motifs within the same dataset revealed a novel composite regulatory

element that contains overlapping binding sites related to SBE and GRE (Fig. 5A, B). Within this novel composite SBE/GRE (labelled SGRE), the centers of SBE and GRE motifs are separated by 8 bp (Fig. 5A, B) and one half-site of each canonical element overlaps with the other (Fig. 5B). The transcriptional activity of the SGRE was assessed using simple reporters and compared to SBE and GRE (Fig. 5C). By comparison to reporters containing canonical GRE or SBE, the SGRE reporter exhibited greater responsiveness to Dex (Fig. 5C). This activity was comparable for two different SGREs, those of the S6K and ArgII genes (Fig. 5C). This greater response to Dex is correlated by higher GR peaks at SGREs compared to other cluster 5 peaks (Fig. S2H compared to F) or to cluster 6 or 7 peaks (Fig. S2C). Mutagenesis of either GRE half-site (mutants 8-11) within the S6K SGRE resulted in complete loss of Dex responsiveness (Fig. 5C). In contrast, mutagenesis of the 5' upstream Stat3 half-site (mutant 7) prevented LIF response but not Dex activation. Computer modeling of Stat3 and GR binding to the SGRE motif indicates that interaction of Stat3 and GR dimers with this sequence is not mutually incompatible and actually, the proximity of GR and Stat3 DBDs indicates the possibility of cooperative interactions between the two dimers (Fig. S5A, B). These data indicate that the composite SGRE has relatively weak Stat3 responsiveness and particularly potent GR response by comparison to canonical SBE and GRE, respectively. We assessed whether this may be reflected in dose-response curves to Dex (with/without LIF) but found similar dose-responses to Dex for both GRE and SGRE reporters (Fig. S5C, D).

Despite the striking organization of the SGRE, it is nonetheless noteworthy that within the hormone responsive genes associated with cluster 5 peaks, those that contain SGREs did not have significantly different responsiveness compared to other genes of the cluster. In fact, we found that 66% of genes/loci that exhibit transcriptional synergism have at least one peak of cluster 5 or cluster 6 within 50 kb of the gene. Examples of genes/loci exhibiting transcriptional synergism and peaks of these clusters are shown in Figure 3I and S6. In particular, the lipocalin 2 (*Lcn2*) gene enhancer that we characterized previously and showed to confer extremely strong synergism between LIF and Dex (Langlais et al., 2008)

has cluster 5 properties (Fig. 3I) with GR and Stat3 peaks that are separated by about 30 bp. It is interesting that this element exhibited at least as strong synergism as the regulatory sequences containing the SGRE. It thus appears that the detailed topology of Stat3 and GR binding within the 200 bp interval defined for cluster 5 is quite permissive. Genes that exhibit synergistic responses to LIF+Dex are associated with cluster 5 but also very often with cluster 6 peaks (Fig. 2 and Fig. 3H). These synergistic responses are correlated with enhanced recruitment of the co-activator p300 (Fig. S4H).

#### **4.4.6. GR-tethered Stat3 enhances transcription**

The binding scheme observed in cluster 6 represents the opposite of cluster 4, namely Stat3 recruitment to GR binding sites in DL-treated cells (Fig. 2, cluster 6). Thus, the *a priori* expectation might have been the reciprocal antagonism but genes associated with this cluster exhibit synergistic responses to LIF and Dex. In order to verify that cluster 6 peaks do indeed represent Stat3 recruitment by tethering to DNA-bound GR, we performed CHIP experiments in cells expressing a DNA binding-deficient Stat3 mutant. Unfortunately, we could not achieve as high expression of Flag-Stat3m by comparison to Flag-Stat3 (Fig. S7A). Nonetheless, the assessment by CHIP of recruitment of these Flag-Stat3 proteins to loci representative of each cluster (Fig. 6A) showed a clear distinction between loci of cluster 6 compared to peaks of clusters that represent direct Stat3 binding to DNA (clusters 3, 4 and 5). The relative preservation of Flag-Stat3m recruitment to cluster 6 peaks is consistent with the purported GR:Stat3 interaction. In order to further support this interpretation, we knocked-down GR expression using siRNA (Fig. 6B). The knockdown of GR resulted in about 95% decrease in GR protein assessed by Western blot (Fig. S7C). This led to  $\geq 90\%$  reduction of GR binding to peaks of clusters 6 and 7 (Fig. S7D) and had no effect on Stat3 peaks of cluster 3 (Fig. 6B). In support of Stat3 recruitment to cluster 6 peaks by tethering, Stat3 recruitment to these peaks was completely dependent on GR (Fig. 6B). Taken collectively, the data clearly support the interpretation that tethering of Stat3 to

GR leads to transcriptional synergism, in striking contrast to the outcome of GR tethering to Stat3.

The GR knock-down (Fig. 6B), together with the Stat3 mutant (Fig. 6A) and GR mutant (Fig. 4A) data suggest that binding of both GR and Stat3 is stabilized at cluster 5 peaks by the presence of the other factor. Thus, GR knock-down had minimal effect on Stat3 recruitment at the peaks (Fig. 6B) and led to greater preservation of GR binding by comparison to cluster 6 or 7 peaks (Fig. S7D). It is interesting to note that the DNA binding mutations of both GR (Fig. 4A) and Stat3 (Fig. 6A) had lesser effect on cluster 5 than on cluster 7 or 3 peaks, respectively. These data suggest that recruitment to peak 5 loci may involve cooperation or stabilization between Stat3 and GR in spite of the varying interval between these factor's binding sites.

## 4.5. Discussion

Cross-talk between Stat and GR pathways is critical for homeostasis of different biological responses (Rogatsky and Ivashkiv, 2006), including inflammatory (Baschant and Tuckermann, 2010) and innate cell defense (Langlais et al., 2008) responses. Further, these pathways are activated and may participate in disease conditions such as inflammatory disease (arthritis, inflammatory bowel disease, etc.), metabolic syndrome and cancer (Yu and Jove, 2004; Grundy et al., 2005). The present work defined the extensive genomic cooperation between GR and Stat3, and in particular, the genome-wide prevalence of GR and Stat3 tethering.

The number of Stat3 regulated genes is small relative to the number of genomic Stat3 binding sites by comparison to GR-regulated genes and GR binding sites. Thus in spite of the strong association of the Stat3 binding peaks with sequences related to the SBE motif, a large number of these peaks/motifs are insufficient on their own to modulate transcription. Whereas LIF-activated genes often have multiple Stat3 binding peaks, other Stat3 peaks not associated with direct regulation of transcription may serve a pioneer function for the action of others TFs. And indeed, the large number of genes that become Gc responsive in presence of LIF/Stat3 but not in their absence supports the idea that Stat3 may at least potentiate the responsiveness to GR. Similarly, the association of motifs for Fox, AP1, CREB, bHLH and SP1 with Stat3 peaks (Fig. S1E, F) is suggestive of interactions with factors of these classes as shown for some of these (Zhang et al., 1999; Loeffler et al., 2005; Niehof et al., 2001). In particular, Stat3 may play a role that is similar to the recently reported potentiation of GR chromatin recruitment by AP1 (Biddie et al., 2011). Despite the interaction of these three TFs (AP1, Stat3 and GR) at some common loci such as the  $\alpha$ 2-macroglobulin gene (Lerner et al., 2003), we did not find particularly frequent association of AP1 sites with Stat3/SBE peaks (Fig. S1E,F).

Genes that are activated by LIF/Stat3 contain SBE motifs whereas Gc-activated genes have GREs (Fig. 7). In contrast, Gc repression was not correlated with direct

genomic recruitment of GR (Fig. 2, 3C and 7). Thus, gene activation is highly correlated with recruitment of the cognate factors. However the converse, i.e. the presence of prototypical peaks, is not a good predictor of transcriptional outcome. In fact, the prediction of transcriptional outcome is more highly correlated for binding schemes that involve close range recruitment of GR and/or Stat3 since recruitment of these two factors within about 200 bp of each other usually results in transcriptional synergism, including when Stat3 is recruited through protein tethering to GR (Fig. 7). The cluster 5 peaks are representative of interactions between Stat3 and GR that often result in synergism. The relative positions of Stat3 and GR binding to these loci are surprisingly diverse however. The ChIP-seq recruitment data are indeed suggestive of cooperation during genomic recruitment at these loci. Thus, the apparent stabilization of Stat3 and GR binding by each other at the cluster 5 loci is intriguing. The extreme situation presented by the SGRE as a composite regulatory element with overlapping binding sites for Stat3 and GR might facilitate direct Stat3/GR interactions. However, the highly variable distance between SBE and GRE (Fig. 5A) is difficult to reconcile with direct interactions. Indeed, it is difficult to imagine that such variable spacing could accommodate similar protein:protein interactions. It is thus possible that the apparent stabilization observed in the DNA binding mutants or GR knock-down experiments (Fig. 4 and 6) could be mediated through the action of interacting cofactors such as p300 (Nakashima et al., 1999). And we did indeed observe enhanced p300 recruitment at peaks of both clusters 5 and 6 when both pathways were stimulated, but not for cluster 4 (Fig. S4H). In this context, the “raison d’être” of the SGRE is intriguing since in isolated context, this element did not produce enhanced sensitivity to ligand activation but rather greater response to Gc/GR (Fig. 5C). This enhanced response to GR is not due to the GRE sequence within the SGRE since in isolation this GRE sequence is not more responsive than other. It is thus possible that the extended SGRE sequence may recruit a stabilizing protein together with GR. This protein is not likely to be Stat3 since genomic Stat3 peaks are dependent on signal activation.

Similar to SGRE and close range Stat3-GR recruitment (cluster 5), the tethering of Stat3 to GR (cluster 6) also results at high frequency in transcriptional synergism (Fig. 2 and 7). It is noteworthy that there are only 4 genes that are repressed by LIF treatment (Langlais et al., 2008) and that three of these have no Stat3 peak in their vicinity (data not shown). These data would be consistent with an inability of Stat3 to repress transcription. Further, this is supported by other examples of Stat3 tethering to CREB (Niehof et al., 2001) and to Sp1 (Loeffler et al., 2005) or of Stat3 interactions with Smad1, AP1, NGFI-B and nuclear receptors (Chen et al., 2000). The present work clearly demonstrated tethered recruitment of Stat3 to GR and the relevance of this interaction was documented genome-wide using a DNA binding-deficient Stat3 mutant (Fig. 6). This mutation prevented Stat3 binding to SBE targets but not its recruitment to GRE-containing targets within cluster 6. This interpretation was further supported by GR siRNA knock-down. The positive transcriptional activity of both GR and Stat3 is thus cumulated in this tethering mode. The opposite transcriptional outcome (i.e. antagonism) associated with GR tethering to Stat3 clearly indicates that the nature of the DNA-bound factor is critical in determining outcome. These opposing outcomes may reflect the dual activities of GR for activation and repression, a property that may not be shared by Stat3. Indeed, there is ample documentation of GR's ability to behave as transcriptional repressor when tethered to AP1, NF $\kappa$ B, NGFI-B and related nuclear receptors (Maira et al., 2003; Baschant and Tuckermann, 2010). In these instances, GR's ability to repress may reflect a masking of its activating potential as much as true repressor activity since the outcome of GR tethering to these activating factors is primarily to block transcription driven by the DNA-bound activators. For example, GR trans-repression of NF $\kappa$ B or IRF3-dependent genes was found to depend on IRF3 displacement (Ogawa et al., 2005). In contrast, GR trans-repression of NGFI-B-dependent POMC gene transcription was correlated with recruitment of the chromatin modifying co-repressor HDAC2 (Bilodeau et al., 2006). In the present work, we did not find enhanced recruitment of co-repressors SMRT or NCoR at cluster 4 peaks but we did not observe changes in p300 recruitment either (Fig. S4F-H).



It is noteworthy that the group of genes that are directly repressed by Gc could not be associated with any GR binding either in our study (Fig. 2 and 7) or in another (Reddy et al., 2009). One recent report identified a putative negative GRE (nGRE) that was proposed as an alternate GR binding site (Surjit et al., 2011). It is intriguing that this putative nGRE is highly related to a Stat binding element (SBE) and indeed, some cluster 4 peaks have such nGRE sequences, such as in the *Bcl3* locus (Fig. 3B). The possibility that Stats may be involved in the activity of these nGREs is consistent with the reported *in vivo* analyses and with transfection studies that were performed in cells treated with IL1 $\beta$  (Surjit et al., 2011). Although it is difficult to compare the gene subsets identified in that study with the present one since different species and tissues were assessed, many loci reported by Surjit et al 2011 have Stat3 peaks in our ChIP-seq studies. It would therefore be interesting to investigate the possibility that the Gc/GR repressor activities identified by Surjit et al 2011 might be dependent on Stat factors.

In summary, we have shown extensive genomic cross-talk between Stat3 and GR, and defined the interaction code that underlies transcriptional regulation by these factors.

## 4.6. Materials and Methods

### 4.6.1. Cell culture, reporters and transfections

AtT-20 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The cells were plated in 12-well plates and transfected the following day with 500 ng per well of luciferase reporter construct using Lipofectamine reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). To generate luciferase reporter constructs, we inserted oligonucleotides representing selected Stat3 and GR binding sequences upstream of the minimal POMC promoter (see Table S3 for the complete oligonucleotide list). All constructs were sequenced to ensure accuracy of DNA sequences. The second day after transfection, cells were stimulated for 4 h with either PBS as vehicle, LIF 10 ng/ml (Chemicon, Billerica, MA), dexamethasone (Dex)  $10^{-7}$  M (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), or a combination of Dex+LIF. For dose response curves, cells were treated in absence of serum with increasing concentrations of Dex (ranging from  $3 \times 10^{-11}$  M to  $10^{-6}$  M) with or without LIF 10ng/ml. Control or GR siRNAs (SMARTpool Dharmacon D-001810-10 and L-045970-01, respectively) were transfected as described above. The siRNA transfection efficiency was measured by FACS using cells transfected concomitantly with a siRNA carrying a green fluorescent Alexa 488 (siGLO, Dharmacon, D-001630-01).

### 4.6.2. Flag-Stat3 and Flag-GR cell populations

Mouse Stat3 and GR cDNAs were amplified from an AtT-20 cDNA library with a forward oligonucleotide containing a 3xFlag tag and cloned downstream of a RSV promoter (Langlais et al., 2011). Stat3 and GR DNA binding domain (DBD) mutants were generated using the QuickChange site-directed mutagenesis protocol (Stratagene, La Jolla, CA). The mutant Stat3, EE→AA and VVV→AAA, does not bind SBE as previously shown by EMSA (Horvath et al., 1995). The GR mutant, C492W and R495Q, was selected for its inability to bind DNA and activate transcription through conventional GREs, and its ability to transactivate Stat5 (Stoecklin et al., 1997). These expression vectors, Flag-Stat3,

Flag-Stat3m, Flag-GR and Flag-GRm, were co-transfected with RSVneo in AtT-20 cells using Lipofectamine reagent and transfected cells were selected in medium containing 400 µg/ml of G418 (Invitrogen). After 8 days under selection, surviving clones were pooled to constitute stable expressing cell pools (about 15000 independent clones for each construct).

#### **4.6.3. Western blots**

Whole cell extracts (WCE) were prepared and analyzed on SDS-PAGE as described (Bilodeau et al., 2006). Western blots were revealed using STAT3 (sc-482), GR (sc-1004), RNA Polymerase II (sc-899) antibodies from Santa Cruz Biotechnology, M2 anti-flag antibody (F1804, Sigma), and homemade Tpit antibody (Lamolet et al., 2001).

#### **4.6.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and QPCR**

AtT-20 cells were grown 3 days in 10 cm Petri dishes to 70% confluence and stimulated with 10 ng/ml LIF and/or  $10^{-7}$  M Dex for 20 min. ChIPs were performed as described previously with little modifications (Langlais et al., 2011). We performed immunoprecipitation with either rabbit IgG (G2018, Sigma), SMRT $\alpha$  (06-891, Millipore, Temeculd, CA), NCoR (sc-8994), p300 (sc-585x), GR (sc-1004) or a combination of phospho-STAT3 (sc-7993) and STAT3 (sc-482x) antibodies (Santa Cruz Biotechnologies). Immune complexes were isolated using a mixture of 20 µl Protein A and 20 µl Protein G Dynabeads (Invitrogen). Enrichment was assessed by QPCR with Perfecta SYBR green PCR kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). Sequences of oligonucleotides used are available upon request.

#### **4.6.5. ChIP-seq library preparation, sequencing and analysis**

Five independent ChIPs for each tested condition STAT3-LIF (S3L), STAT3-Dex+LIF (S3DL), GR-Dex+LIF (GRDL), GR-Dex (GRD) and control IgG (CTL) were

pooled before library preparation. The libraries and flow cells were prepared by the McGill University and Génome Québec Innovation Centre following Illumina recommendations (Illumina, San Diego, CA). The ChIP libraries were sequenced on the Illumina GAIIx high-throughput sequencer. The sequencing yielded between 29 and 66 million 36 bp sequences per samples (see Table S1 for details). ChIP-seq data analysis is described in details in Supplemental Experimental Procedures.

#### **4.6.6. Expression profiling data**

The list of genes regulated by hormone treatment in AtT-20 cells was retrieved from our previous work (Langlais et al., 2008). For the purpose of the present work, we included genes exhibiting a significant 2-fold change ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) after 3 h treatment of LIF (10 ng/ml) and/or Dex ( $10^{-7}$  M) over vehicle treated cells.

## **4.7. Footnotes**

### ***Acknowledgements***

We acknowledge the generous support of Génome Québec/McGill Genome Center for processing of ChIP-seq experiments. We are most grateful to Johanne Duhaime for her help in data analysis and to Brian Wilkes for molecular modeling (Peter W. Schiller, CIHR grant MOP89716). We thank Lise Laroche for her expert secretarial assistance.

### ***Funding***

The work of David Langlais was supported by a fellowship from Université de Montréal. The work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to J.D.

### ***Disclosure statement***

The authors declare no conflict of interest.

## 4.8. References

1. Aittomaki,S., Pesu,M., Groner,B., Janne,O.A., Palvimo,J.J., and Silvennoinen,O. (2000). Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol.* *164*, 5689-5697.
2. Baschant,U. and Tuckermann,J. (2010). The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem. Mol Biol* *120*, 69-75.
3. Biddie,S.C., John,S., Sabo,P.J., Thurman,R.E., Johnson,T.A., Schiltz,R.L., Miranda,T.B., Sung,M.H., Trump,S., Lightman,S.L., Vinson,C., Stamatoyannopoulos,J.A., and Hager,G.L. (2011). Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding. *Mol Cell* *43*, 145-155.
4. Bilodeau,S., Vallette-Kasic,S., Gauthier,Y., Figarella-Branger,D., Brue,T., Berthelet,F., Lacroix,A., Batista,D., Stratakis,S., Hanson,J., Meij,B., and Drouin,J. (2006). Role of Brg1 and HDAC2 in GR *trans*-repression of pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev.* *20*, 2871-2886.
5. Bulger,M.I. and Groudine,M. (2011). Functional and Mechanistic Diversity of Distal Transcription Enhancers. *Cell* *144*, 327-339.
6. Chen,T., Wang,L.H., and Farrar,W.L. (2000). Interleukin 6 Activates Androgen Receptor-mediated Gene Expression through a Signal Transducer and Activator of Transcription 3-dependent Pathway in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* *60*, 2132-2135.
7. Engblom,D., Kornfeld,J.W., Schwake,L., Tronche,F., Reimann,A., Beug,H., Hennighausen,L., Moriggl,R., and Schutz,G. (2007). Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes Dev* *21*, 1157-1162.
8. Glass,C.K. and Saijo,K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 365-376.

9. Horvath,C.M., Wen,Z., and Darnell,J.E., Jr. (1995). A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* *9*, 984-994.
10. Jonat,C., Rahmsdorf,H.J., Park,K.-K., Cato,A.C.B., Gebel,S., Ponta,H., and Herrlich,P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* *62*, 1189-1204.
11. Kadonaga,J.T. (2004). Regulation of RNA Polymerase II Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors. *Cell* *116*, 247-257.
12. Kagey,M.H., Newman,J.J., Bilodeau,S., Zhan,Y., Orlando,D.A., van Berkum,N.L., Ebmeier,C.C., Goossens,J., Rahl,P.B., Levine,S.S., Taatjes,D.J., Dekker,J., and Young,R.A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* *doi:10.1038/*, 1-6.
13. Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., Brue,T., Enjalbert,A., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* *104*, 849-859.
14. Langlais,D., Couture,C., Balsalobre,A., and Drouin,J. (2008). Regulatory network analyses reveal genome-wide potentiation of LIF signaling by glucocorticoids and define an innate cell defense response. *PLoS. Genet.* *4*, e1000224.
15. Langlais,D., Couture,C., Sylvain-Drolet,G., and Drouin,J. (2011). A pituitary-specific enhancer of the POMC Gene with preferential activity in corticotrope cells. *Mol. Endocrinol.* *25*, 348-359.
16. Lee,T.I. and Young,R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* *34*, 77-137.
17. Lerner,L., Henriksen,M.A., Zhang,X., and Darnell,J.E., Jr. (2003). STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev.* *17*, 2564-2577.
18. Loeffler,S., Fayard,B., Weis,J., and Weissenberger,J. (2005). Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in

- vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int. J. Canc.* *115*, 202-213.
19. Maira,M.H., Martens,C., Batsche,E., Gauthier,Y., and 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.
  20. Nakashima,K., Yanagisawa,M., Arakawa,H., Kimura,N., Hisatsune,T., Kawabata,M., Miyazono,K., and Taga,T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* *284*, 479-482.
  21. Niehof,M., Streetz,K., Rakemann,T., Bischoff,S.C., Manns,M.P., Horn,F., and Trautwein,C. (2001). Interleukin-6-induced Tethering of STAT3 to the LAP/C/EBP+ Promoter Suggests a New Mechanism of Transcriptional Regulation by STAT3. *J. Biol. Chem.* *276*, 9016-9027.
  22. Oakley,R.H. and Cidlowski,J.A. (2011). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* *286*, 3177-3184.
  23. Ogawa,S., Lozach,J., Benner,C., Pascual,G., Tangirala,R.K., Westin,S., Hoffmann,A., Subramaniam,S., David,M., Rosenfeld,M.G., and Glass,C.K. (2005). Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* *122*, 707-721.
  24. Philips,A., Maira,M.H., Mullick,A., Chamberland,M., Lesage,S., Hugo,P., and Drouin,J. (1997). Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 5952-5959.
  25. Ray,A. and Prefontaine,K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 752-756.
  26. Reddy,T.E., Pauli,F., Sprouse,R.O., Neff,N.F., Newberry,K.M., Garabedian,M.J., and Myers,R.M. (2009). Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.* *19*, 2163-2171.



27. Rogatsky,I. and Ivashkiv,L.B. (2006). Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 68, 1-12.
28. Schindler,C., Levy,D.E., and Decker,T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 282, 20059-20063.
29. Schule,R., Rangarajan,P., Kliewer,S., Ransone,L.J., Bolado,J., Yang,N., Verma,I.M., and Evans,R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.
30. Stocklin,E., Wissler,M., Gouilleux,F., and Groner,B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726-728.
31. Stoecklin,E., Wissler,M., Moriggl,R., and Groner,B. (1997). Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6708-6716.
32. Surjit,M., Ganti,K.P., Mukherji,A., Ye,T., Hua,G., Metzger,D., Li,M., and Chambon,P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145, 224-241.
33. Takeda,T., Kurachi,H., Yamamoto,T., Nishio,Y., Nakatsuji,Y., Morishige,K., Miyake,A., and Murata,Y. (1998). Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid. *J. Endocrinol.* 159, 323-330.
34. Vegiopoulos,A. and Herzig,S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 43-61.
35. Wyszomierski,S.L. and Rosen,J.M. (2001). Cooperative effects of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein-beta) on beta-casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 15, 228-240.
36. Yang-Yen,H.F., Chambard,J.C., Sun,Y.L., Smeal,T., Schmidt,T.J., Drouin,J., and Karin,M. (1990). Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.

37. Yu,H. and Jove,R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4, 97-105.
38. Zhang,X., Wrzeszczynska,M.H., Horvath,C.M., and Darnell,J.E., Jr. (1999). Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7138-7146.
39. Zhang,Y., Liu,T., Meyer,C.A., Eeckhoute,J., Johnson,D.S., Bernstein,B.E., Nusbaum,C., Myers,R.M., Brown,M., Li,W., and Liu,X.S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9, R137.
40. Zhang,Z., Jones,S., Hagood,J.S., Fuentes,N.L., and Fuller,G.M. (1997). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 30607-30610.

## 4.9. Figure Legends

### Figure 4.1. Different modalities of Stat3 and GR recruitment to genomic loci.

**A)** Clustering analysis of 5 670 peaks of unique chromosomal position identified for Stat3 and/or GR by ChIP-seq in AtT-20 cells treated with LIF (L), dexamethasone (Dex) or both (DL). The diagram illustrates the number and position of sequence reads per  $10^6$  sequences within a 2 kb interval of the ChIP-seq peak. The analysis revealed 8 major clusters (outlined by bars on right) of unique binding properties. **B)** Binding scheme for Stat3 (red) and GR (blue) in each condition of hormone treatment as indicated at bottom. The number of peaks in each cluster is indicated together with a profile that represents the average read density of all peaks in the cluster. **C)** Occurrence of canonical Stat3 binding element (SBE, red) and glucocorticoid response element (GRE, blue) in each cluster relative to position of major peak. **D)** Schematic representation of the putative binding scheme for Stat3 (red box) and GR (blue oval) for each cluster. See also Figures S1 and S2.

### Figure 4.2. Correlation between transcriptional outcome and Stat3/GR recruitment schemes.

Expression profiling studies in AtT-20 cells (Langlais et al., 2008) were categorized as a function of their responses to 3 h treatment with LIF, Dex, or their combination. Thereafter, these hormone responsive genes were queried for binding peaks in their vicinity (within 20kb of the gene). Genes were either upregulated by the indicated hormone (up) or downregulated (down). Synergistic effects of Dex+LIF (DL) is indicated by synergy whereas antagonistic responses are labeled as such. For each cluster, hormone responsive genes are compared to data for all regulated genes and for all genes expressed in AtT-20 cells. Few genes were associated with clusters 1 and 2 and they exhibit properties similar to cluster 3. Similarly, cluster 8 gene association exhibits properties similar to cluster 7; hence, clusters 1, 2 and 8 are not represented in the figure. For each cluster, the histograms represent the corresponding hormone response profiles together with prototypical ChIP-seq binding data for the corresponding peaks and with a representation of the putative Stat3 and GR binding schemes.

**Figure 4.3. Position of transcription factor binding peaks relative to target genes with different hormone response patterns.**

**A)** Positions of Stat3 peaks relative to transcription start sites (TSS) of LIF upregulated genes compared to the presence of Stat3 peaks relative to all genes expressed in AtT-20 cells. **B)** Example of a LIF-upregulated gene (*Bcl3*) and ChIP-seq binding profiles revealing four individual Stat3 peaks of cluster 3 type. Within this locus, only the *Bcl3* gene is upregulated by LIF (red) whereas the two flanking genes are either not expressed or not hormone responsive as indicated by the color code at the bottom of the figure. **C)** Position of GR binding peaks relative to TSS of Dex upregulated genes compared to Dex downregulated or all genes in the dataset. **D)** The *Aldh8a1* gene is upregulated by Dex and the corresponding locus contains multiple GR peaks of the cluster 7 type. **E)** An example of a Dex downregulated gene, *N-myc*, together with ChIP-seq data showing the absence of either Stat3 or GR peaks within a large genomic region surrounding the *N-myc* gene. **F)** Position of Stat3 and/or GR peaks relative to TSS of genes stimulated by LIF and antagonized by Dex treatment. These loci often exhibit multiple cluster 3 Stat3 peaks and one or few cluster 4 peak(s). Cluster 5, 6 and 7 peaks are not shown because of marginal association with these genes. **G)** The *Arid5b* gene which is upregulated by LIF and antagonized by Dex contains a single cluster 4 peak in its promoter region. **H)** Positions of Stat3 and GR peaks relative to TSS of genes that exhibit synergistic activation by Dex and LIF. These genes are principally associated with cluster 5 and cluster 6 peaks. **I)** The *Lcn2* locus contains a single peak of cluster 5 type located 22 kb upstream of the *Lcn2* gene and 5 kb downstream of the *Slc25a25* gene which is also subject to synergistic activation. See also Figure S3.

**Figure 4.4. DNA-independent recruitment of GR to Stat3 targets.**

The requirement on GR DNA binding ability for recruitment to peaks of different clusters was tested by ChIP using populations of AtT-20 cells stably expressing a flagged chimera of GR (Flag-GR). The relative ability of a GR mutant deficient in DNA binding (C492W and R495Q) (Stoecklin et al., 1997) was assessed relative to recruitment of wild-type GR.

Mutant GR was recruited at a very low level to GRE-containing peaks of cluster 5, 6 and 7, but its recruitment was retained by peaks of cluster 4 that harbor SBE, but no GRE sequences. The box plot presents the mean values for 4 to 7 peaks of each cluster ( $\pm$  s.e.m.) from a representative of three experiments. Data for each locus are presented in Figure S6C. The p values were calculated relative to cluster 7 with Student's T-test (\*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; n.s. not significant). See also Figure S4.

**Figure 4.5. A novel composite regulatory element containing Stat3 and GR binding motifs.**

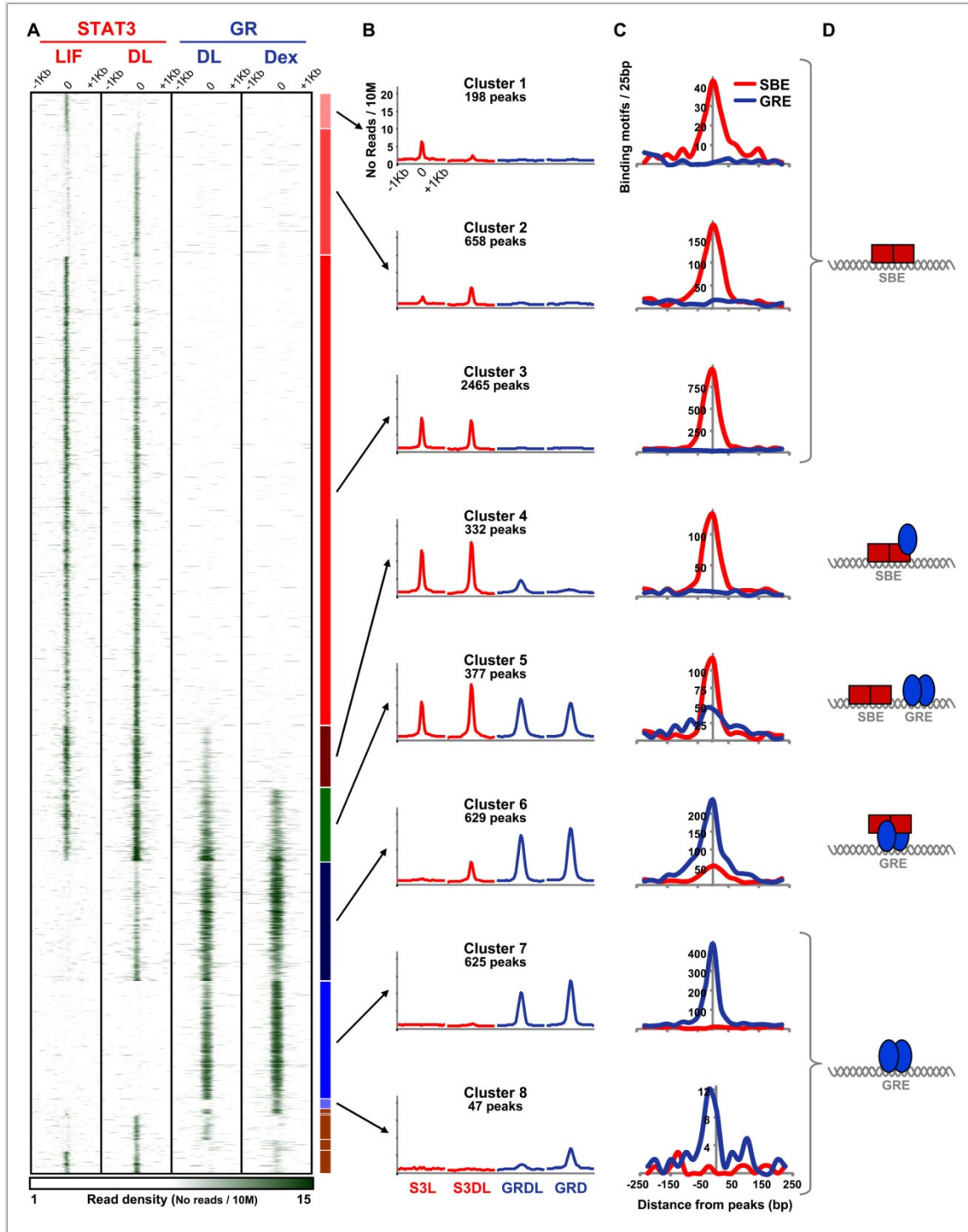
**A)** Distance between SBE and GRE motifs found under cluster 5 peaks. This analysis revealed only one preferred arrangement of 8 bp between the center of each motif. **B)** *De novo* search for motifs within peaks of cluster 5 revealed a unique arrangement of SBE and GRE motifs separated by a 8 bp interval; this composite regulatory element (SGRE) contains overlapping SBE and GRE motifs. **C)** Transcriptional activity of luciferase reporters containing minimal promoter together with trimers of various hormone responsive elements including GRE, SBE and SGRE. The activity of each reporter was assessed upon transfection in AtT-20 cells and treatment with LIF, Dex, or both as indicated. Data are shown as means  $\pm$  s.e.m. of at least 4 experiments, each performed in duplicates. See also Figure S5.

**Figure 4.6. DNA-independent recruitment of Stat3 to GR targets.**

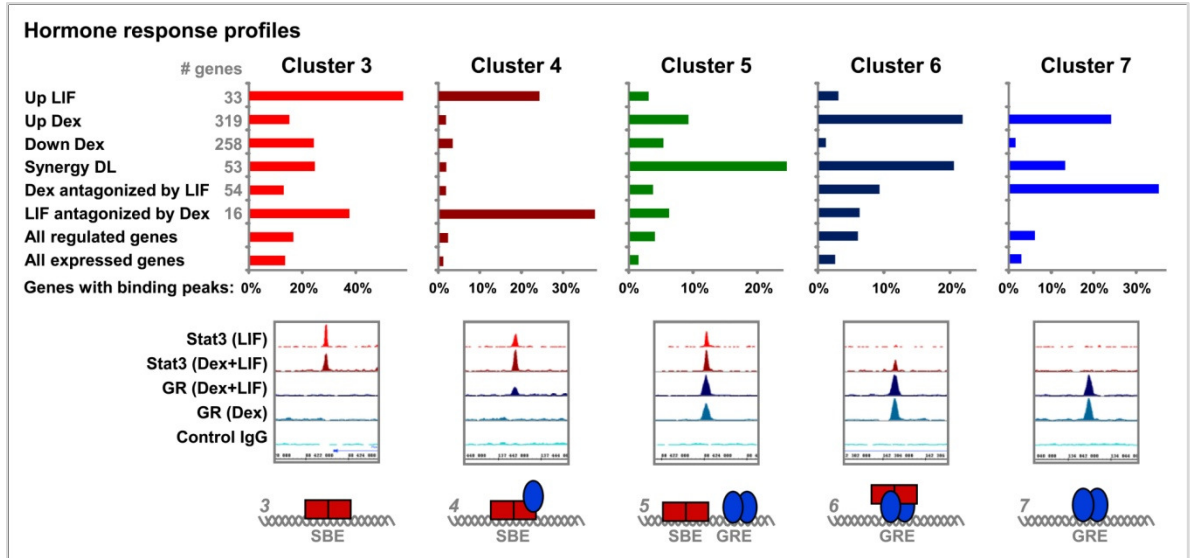
**A)** Recruitment of a DNA binding mutant of Stat3 relative to wild-type Flag-Stat3 for peaks of different clusters. Whereas the DNA binding Stat3 mutant abrogated binding to peaks of clusters 3, 4 and 5, significant recruitment was retained to peaks of cluster 6 that represent GR-dependent recruitment of Stat3. Relative recruitment of the Stat3 mutant is low because its expression level did not reach the level of wild-type Flag-Stat3 (Fig. S7A). **B)** Effect of GR siRNA knockdown on Stat3 recruitment to peaks of different clusters. GR siRNA knockdown that decreased GR levels by about 95% (Fig. S7C) resulted in almost complete loss of Stat3 recruitment to peaks of clusters 6 compared to cluster 3.

Intermediate losses of Stat3 recruitment were observed for clusters 4 and 5 consistent with cooperative binding with GR for these clusters. (\*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ). The p values were calculated relative to the indicated cluster using Student's T-test. See also Figures S6 and S7.

**Figure 4.7. Schematic representation of various schemes of Stat3 and GR genomic recruitment correlated with hormone response and transcriptional outcome.**



**Figure 4.1.: Different modalities of Stat3 and GR recruitment to genomic loci.**



**Figure 4.2.: Correlation between transcriptional outcome and Stat3/GR recruitment schemes.**



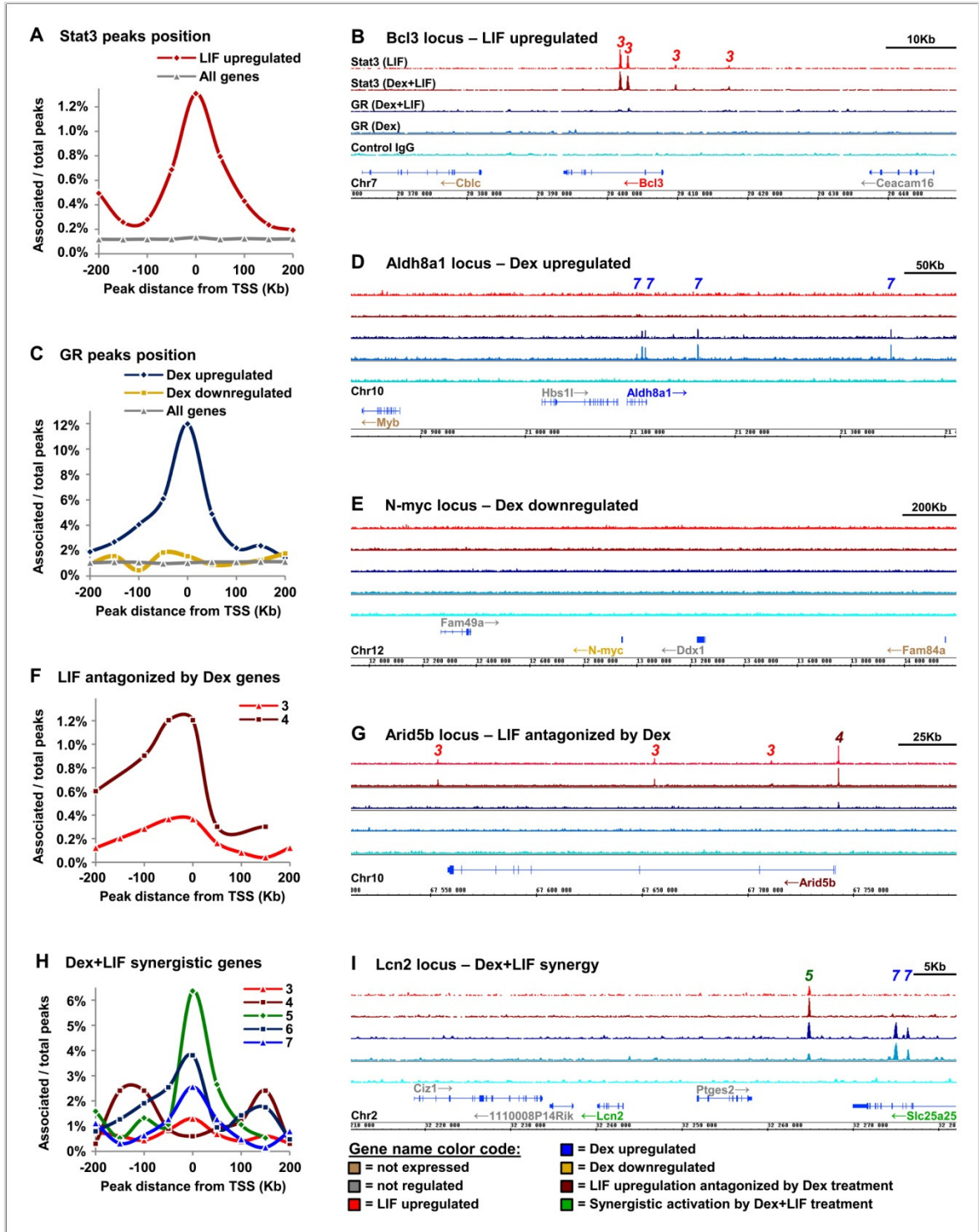
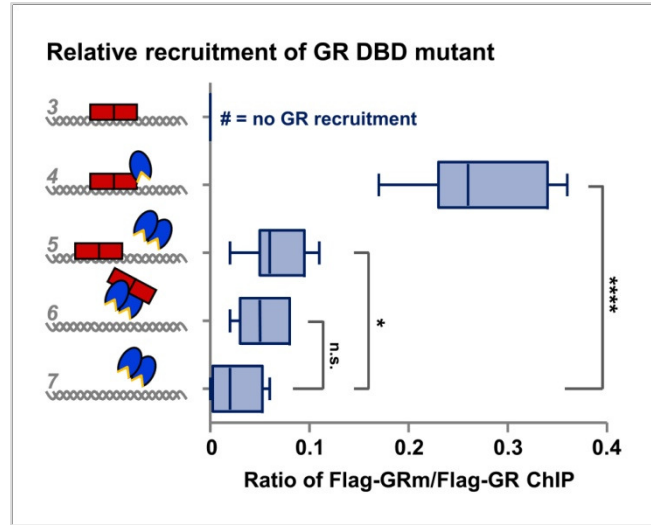
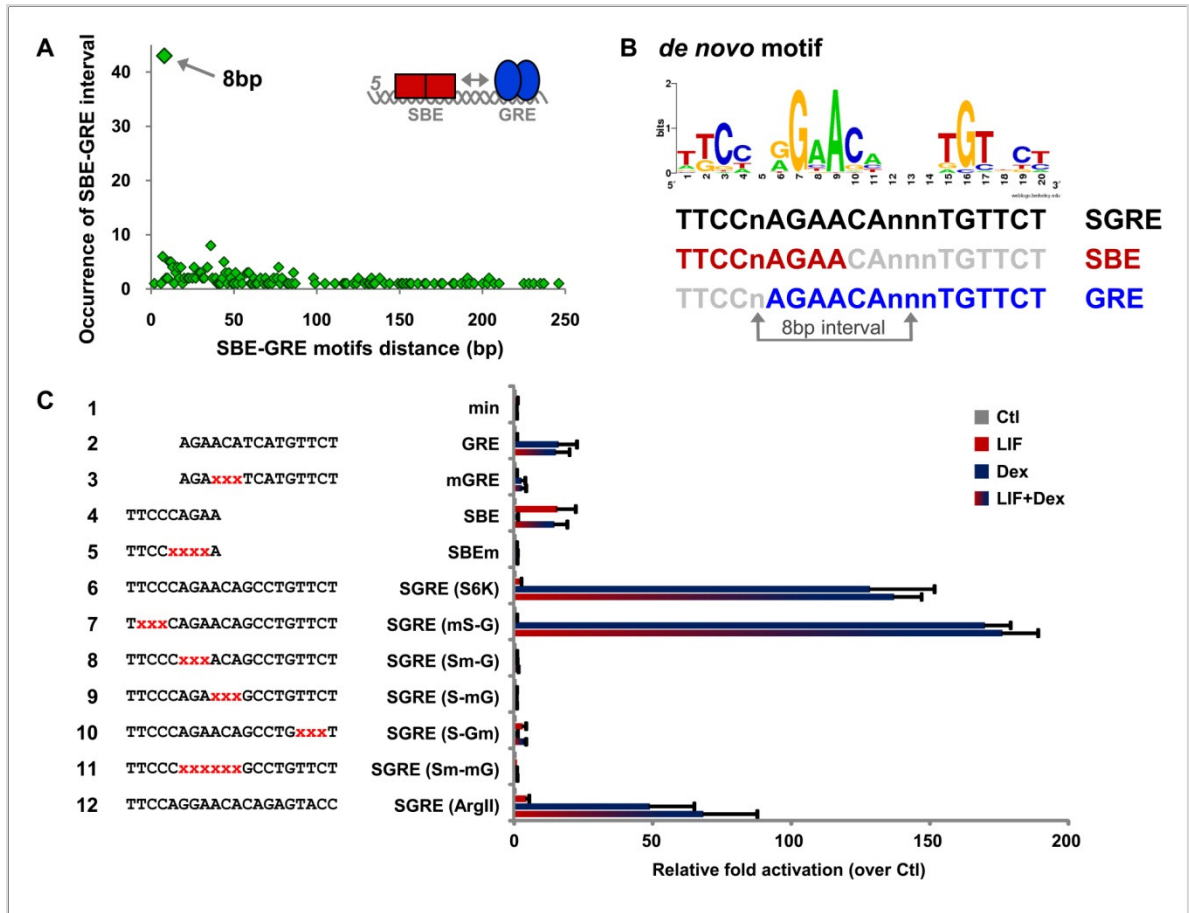


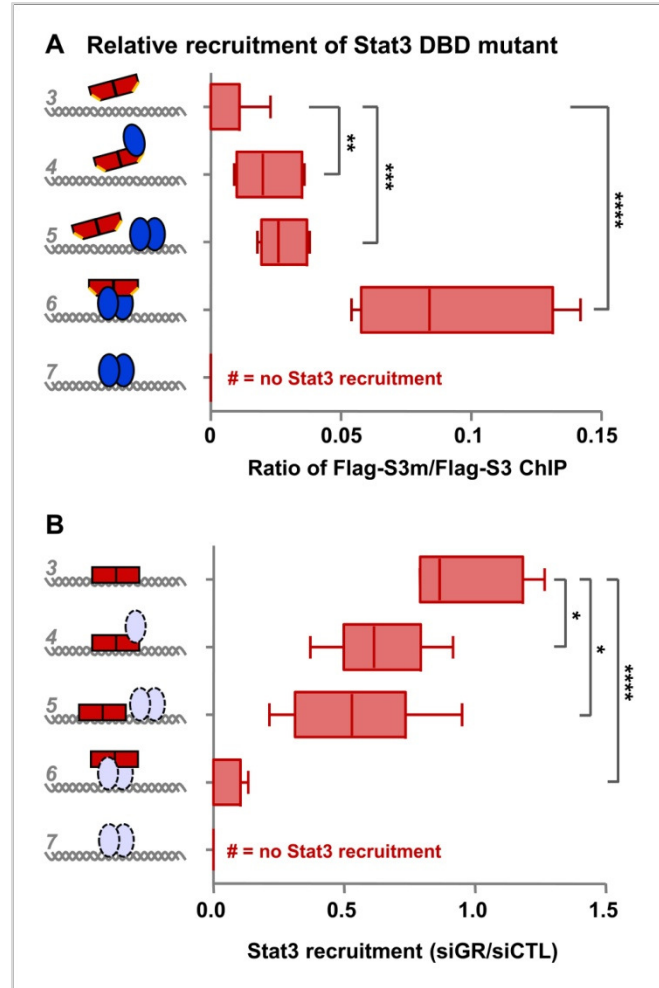
Figure 4.3.: Position of transcription factor binding peaks relative to target genes with different hormone response patterns.



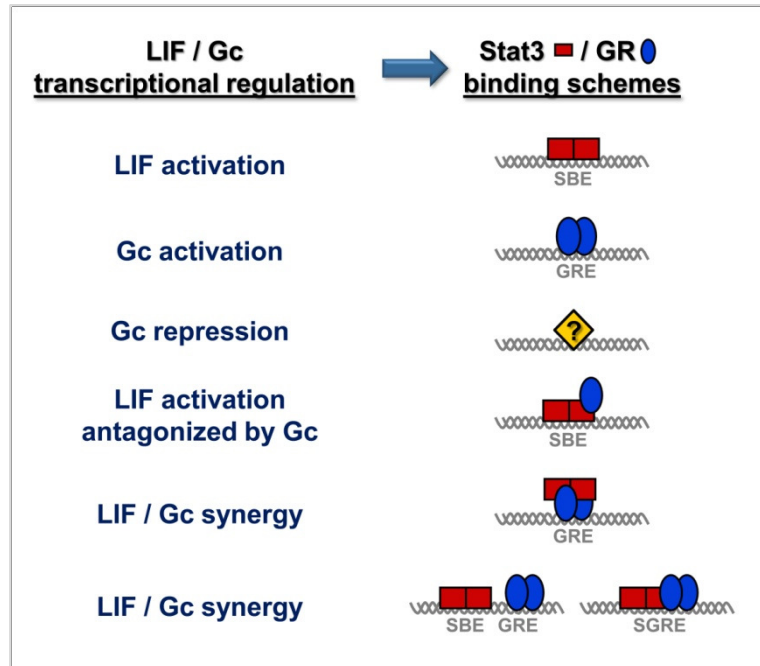
**Figure 4.4.: DNA-independent recruitment of GR to Stat3 targets.**



**Figure 4.5.: A novel composite regulatory element containing Stat3 and GR binding motifs.**



**Figure 4.6.: DNA-independent recruitment of Stat3 to GR targets.**



**Figure 4.7.:** Schematic representation of various schemes of Stat3 and GR genomic recruitment correlated with hormone response and transcriptional outcome.

## 4.10. Supplementary Materials and Methods

### 4.10.1. ChIP-seq peak finding analysis

We trimmed the first base of the 36 bp sequence for the mapping process because of uneven quality. The reads mapping to the mouse mm9 genome assembly was performed with Bowtie using the following settings: bowtie -t -o 7 --solexa1.3-qual --best --trim5 1 mm9 (Langmead et al., 2009). 95-96% of the sequence reads were mapped to the reference genome. To identify significant Stat3 and GR binding events, we processed the mapped sequence reads with MACS version 1.3.7.1 using matching number of IgG control reads to Stat3 or GR samples. We used the following setting in MACS: --format BOWTIE --wig --tsize 35 --bw 250 --mfold 7 --pvalue 1e-8 --gsize 1870000000 (Zhang et al., 2008). The complete number of sequence reads and peaks are listed in Table S1. To compare Stat3 and GR genomic recruitment we have selected peaks of p value  $\leq 10^{-8}$ . The contiguous binding events enclosed in these lists of highly significant binding peaks were separated with PeakSplitter (Salmon-Divon et al., 2010). Thereafter, we generated a list of unique chromosomal position by removing overlapping peaks ( $\pm 200$  bp) from the 4 conditions (S3L, S3DL, GRDL and GRD). From this list of 5760 unique chromosomal positions, we retrieved the total number of sequence reads (not filtered for duplicate reads) under the peak center for each ChIP-seq sample, including CTL. After correction for the total number of reads in sample (reads under peak center / 10M total reads), we clustered the peaks for presence or absence of binding in the four experiments. The different Stat3 and GR binding schemes were attributed a cluster number (Figure 1 and Table S2). From all clusters, 8 represent the major binding schemes and were used for further analyses.

### 4.10.2. *De novo* motif analyses

We extracted 100bp of DNA sequence surrounding the binding peaks from UCSC web site (Kent et al., 2002). The sequences of each cluster were processed using MEME (Bailey et al., 2006) and AlignAce (Roth et al., 1998). The graphical representation of the

position weight matrices obtained from these analyses were generated with WebLogo (Figure S1) (Crooks et al., 2004).

#### **4.10.3. Transcription factor binding motifs searches**

We searched for the presence of canonical SBE or GRE motifs in 500 bp sequences surrounding each binding peak using the MatInspector software (Genomatix, München, Germany). The same sequence set was challenged against all known transcription factor binding motifs and the resulting occurrence for each motif was compared to the mean number of predicted binding sites in 3 sets of randomly picked 500 bp promoter regions.

#### 4.11. Supplementary Figure Legends

**Table 4.S1. Stat3 and GR ChIP-seq experiments summary, related to Figure 1.**

For each ChIP-seq experiment conducted on AtT-20 cell nuclei in control or in hormone-treated cells, the total number of the DNA sequence reads is indicated together with the number of high confidence peaks ( $p \leq 10^{-8}$ , determined by MACS algorithm). Compilation of all data have identified 5 670 peaks of unique (within 200 bp) chromosomal localization.

**Table 4.S2. Stat3 and GR ChIP-seq binding peak list (p value threshold  $\leq 10^{-8}$ ), related to Figure 1.**

Complete list of unique chromosomal positions determined by the overlap (within 200 bp) of Stat3 and GR ChIP-seq data. For each peak, cluster number and the number of sequence reads at peak center (per  $10^7$  reads) are indicated.

**Table 4.S3. Oligonucleotides used for luciferase reporter constructs, related to Figure 5.**

**Figure 4.S1. Search for *de novo* or canonical sequence motifs around peaks of each cluster of Stat3 and/or GR binding scheme, related to Figure 1.**

**A)** Results of *de novo* motif searches for each cluster within 100 bp of peak maxima using MEME algorithm. These analyses yielded sequences related to the canonical SBE for clusters 1, 2, 3, 4 and 5 and sequences related to canonical GRE for clusters 5, 6, 7 and 8.

**B)** The proportion of peaks ( $\pm 100$  bp) containing sequences related (with a similarity higher than the Genomatix optimized matrix threshold) to the canonical SBE and GRE motifs is shown for each cluster. **C)** Sequences of the canonical SBE and GRE motifs used in C).

**D)** Search for *de novo* sequence motifs associated with Stat3 peaks that did not score positive in the search for the canonical SBE. The motifs that were found in these analyses correspond to less conserved SBE-type sequences. **E)** Relative enrichment of indicated motifs in the Stat3/GR ChIP-seq dataset shown for each cluster as relative fold enrichment by comparison to the mean of motif occurrence in three sets of 5000 promoter (-100 bp to TSS) sequences. **F)** Position of TF binding motifs other than SBE and GRE that are



enriched in some Stat3/GR binding clusters. **G)** Comparison of the relative enrichment for Sp1 motif within sequences of cluster 3 relative to sequences of clusters 4, 5, 6 and 7.

**Figure 4.S2. Peak heights for Stat3 and GR ChIP-seq peaks in various hormone conditions, related to Figure 1.**

**A)** Average heights (number of reads per  $10^7$  reads) of Stat3 peaks in LIF-treated AtT-20 cells. The average height of peaks associated with LIF upregulated genes (LIF active) is significantly higher than the mean height of any cluster. **B)** Average height of Stat3 peaks identified in Dex+LIF-treated AtT-20 cells. **C)** GR peak heights for different clusters in AtT-20 cells treated with Dex+LIF. **D)** GR peak heights in AtT-20 cells treated with Dex. Dex upregulated genes (Dex active) exhibit significantly higher average heights than any cluster of peaks. **E)** Peak heights for each cluster in control IgG condition. **F)** Comparison of cluster 5 peak heights for Stat3 or GR as indicated under the hormone treatment. **G)** Relative enhancement of cluster 5 peak heights for Stat3 and GR in Dex+LIF compared to LIF or Dex conditions as indicated. **H)** Average peak heights for Stat3 or GR present over SGRE motifs in various hormone conditions as indicated.

**Figure 4.S3. Distribution of Stat3 and/or GR binding peaks of each cluster type relative to TSS of associated Dex responsive genes, related to Figure 3.**

**A)** Data for Dex upregulated genes. **B)** Data for Dex downregulated genes. **C)** ChIP-seq binding profiles of genes upregulated by LIF and antagonized by Dex treatment. The Rgs4 gene is associated with three peaks of cluster 4 type. The Socs3 locus contains multiple cluster 3 type Stat3 binding sites and one occurrence of clusters 4 type. The Morc1 locus contains three cluster 3 type of Stat3 binding sites and one cluster 4 site located within the Morc1 gene. Other genes present at these loci are not expressed in AtT-20 cells, as indicated by the color scheme at bottom.

**Figure 4.S4. Analysis of AtT-20 cells stably expressing Flag-GR or mutant Flag-GR (Flag-GRm) and cofactor recruitment, related to Figure 4.**

**A)** Western blot comparing expression of Flag-GR with Flag-GRm and showing equivalent levels of expression for both Flag proteins. Western blot for RNA PolIII is used as loading control. **B)** Western blot using GR antibody reveals both endogenous AtT-20 cell GR and slower migrating Flag-GR. **C)** Ratio of enrichment for Flag relative to GR antibody for each peak chosen within each of clusters 3, 4, 5, 6 and 7 for analysis by ChIP-QPCR. Each bar represents data for the indicated peak; these data were averaged in Figure 4. **D)** Recruitment of Stat3 to randomly chosen subsets of cluster 4, 5 and 6 peaks assessed by ChIP-QPCR. The box plot presents the mean values for 4 to 7 peaks of each cluster ( $\pm$  s.e.m.) from a representative of three experiments. The p values were calculated between each conditions within each cluster using Student's T-test (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ). **E-H)** Same as D) for GR, SMRT, NCoR and p300 ChIPs, respectively.

**Figure 4.S5. SGRE composite regulatory element binding and response properties, related to Figure 5.**

Computer modeling of Stat3 and GR DNA binding domain crystal structures docked onto cognate sequences on the SGRE composite regulatory element described in the present work. Homodimers of each DNA binding domains are shown reflecting the presence of palindromic cognate sequences for each (Becker et al., 1998; Meijssing et al., 2009). **A)** Side view. **B)** View down the DNA axis. The DNA binding domains of GR and Stat3 are in close proximity but do not interfere with each other on the novel SGRE regulatory element. **C)** Transcription dose-response curves to increasing Dex concentrations for luciferase reporters containing trimers of the canonical GRE, the S6K SGRE on the ArgII SGRE upstream of a minimal promoter. Transfected AtT-20 cells were treated for 4 h with the indicated concentrations of Dex in serum-free medium. Data represent means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments each performed in duplicates. **D)** Same experiment as in C) performed in the presence of 10 ng/ml LIF.

**Figure 4.S6. ChIP-seq profiles for genes that are subject to synergistic activation by LIF and Dex treatment, related to Figure 6.**

At the metallothionein locus, the Mt1 and Mt2 genes are synergistically activated by Stat3 and GR, and the promoter region of each of these genes contain binding peaks of the cluster 5 type whereas the Mt3 and Mt4 genes present within the same locus are either not expressed or hormone-independent, as indicated by the color code at bottom. The Sgk locus has two peaks of the cluster 6 type. The Nfkbia locus contains peaks of clusters 5, 6 and 7 types. The Spsb1 locus contains multiple peaks of the clusters 2 and 3 types together with two sites each of clusters 5 and 6 types.

**Figure 4.S7. Detailed analysis of Stat3 tethering to GR, related to Figure 6.**

**A)** Western blot analysis of AtT-20 cells stably expressing Flag-Stat3 and the DNA binding deficient mutant of Flag-Stat3. The Flag blot shows lower expression of the mutant relative to wild-type Stat3. RNA PolII Western blot was used as loading control. **B)** Recruitment ratios for Flag compared to Stat3 antibodies at each of the indicated peaks and clusters for wild-type and mutant Flag-Stat3. Each bar represents data for the indicated peak; these data were averaged in Figure 6A. **C)** Western blot analysis of GR indicates a decrease of about 95% GR expression in AtT-20 cells treated with GR siRNA compared to control siRNA. Tpit Western blot is used as loading control. **D)** ChIP QPCR data for GR recruitment at randomly chosen loci of each cluster. Greater decreases of GR recruitment were observed at targets of direct GR:DNA interaction (clusters 6, 7) compared to peaks associated with protein interactions between GR and Stat3 (clusters 4, 5).

*Note: Les tables 4.S2 et 4.S3 représentent des tableaux en format excel, donc ils seront disponibles sur le site internet de l'éditeur.*

ChIP-seq experiments	Total number of reads	Number of peaks (p≤10 <sup>-8</sup> )	Number of unique chromosomal positions
IgG control	59,7M	N/A	N/A
Stat3-LIF	29,1M	3103	5670
Stat3-Dex+LIF	48,5M	4188	
GR-Dex+LIF	66,4M	1118	
GR-Dex	63,2M	1316	

**Table 4.S1.: Stat3 and GR ChIP-seq experiments summary.**

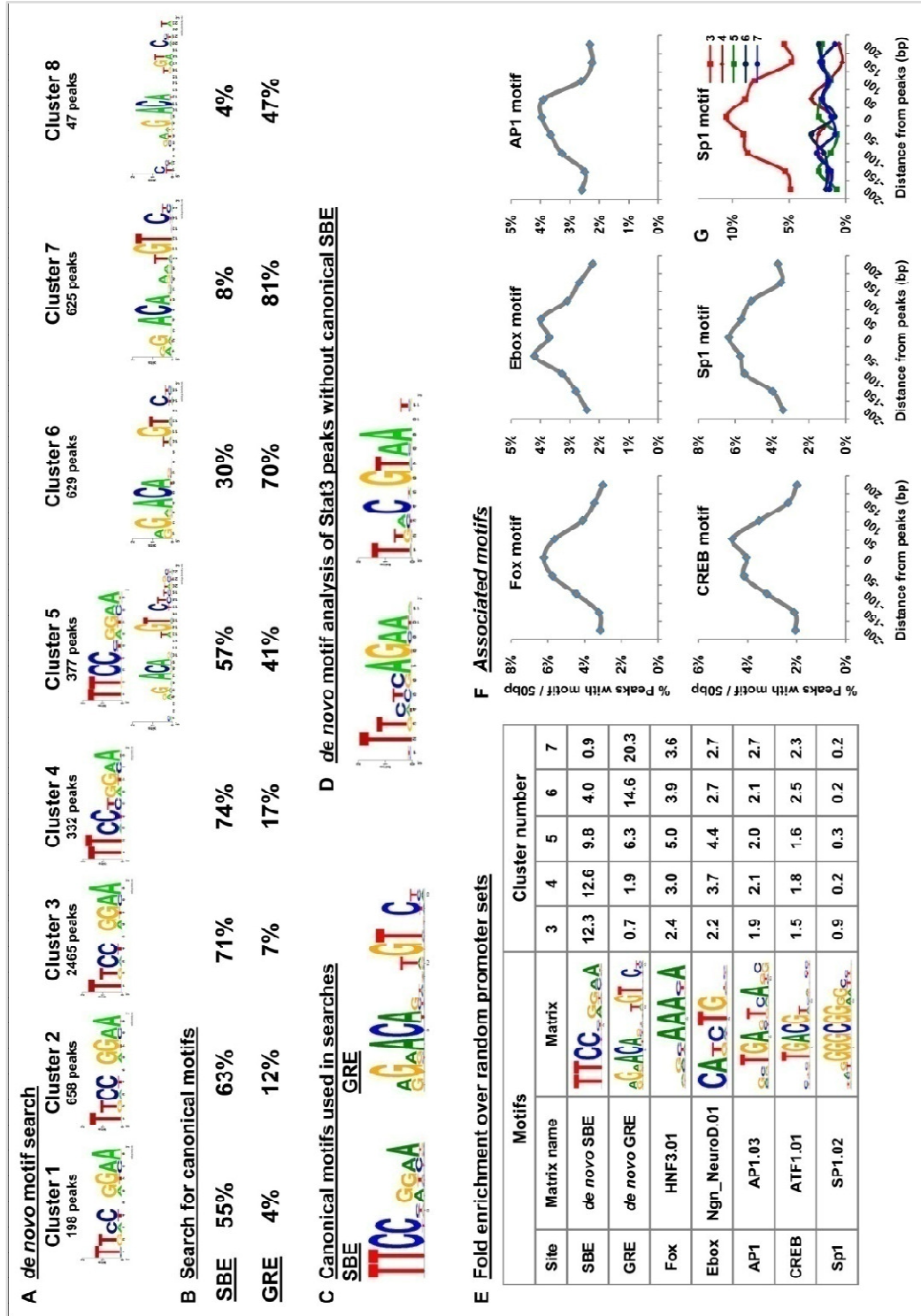


Figure 4.S1.: Search for *de novo* or canonical sequence motifs around peaks of each cluster of Stat3 and/or GR binding scheme.

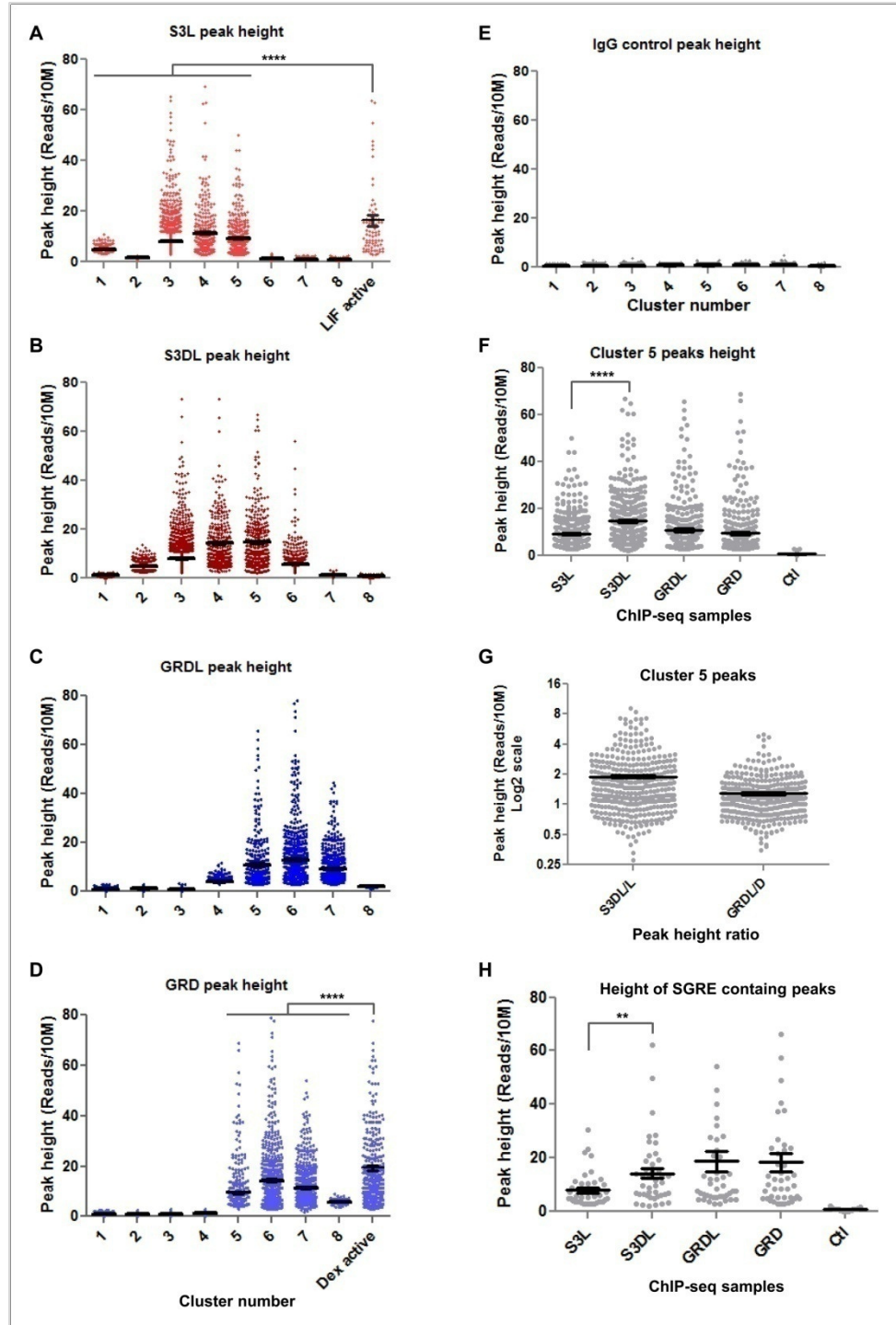


Figure 4.S2.: Peak heights for Stat3 and GR CHIP-seq peaks in various hormone conditions.

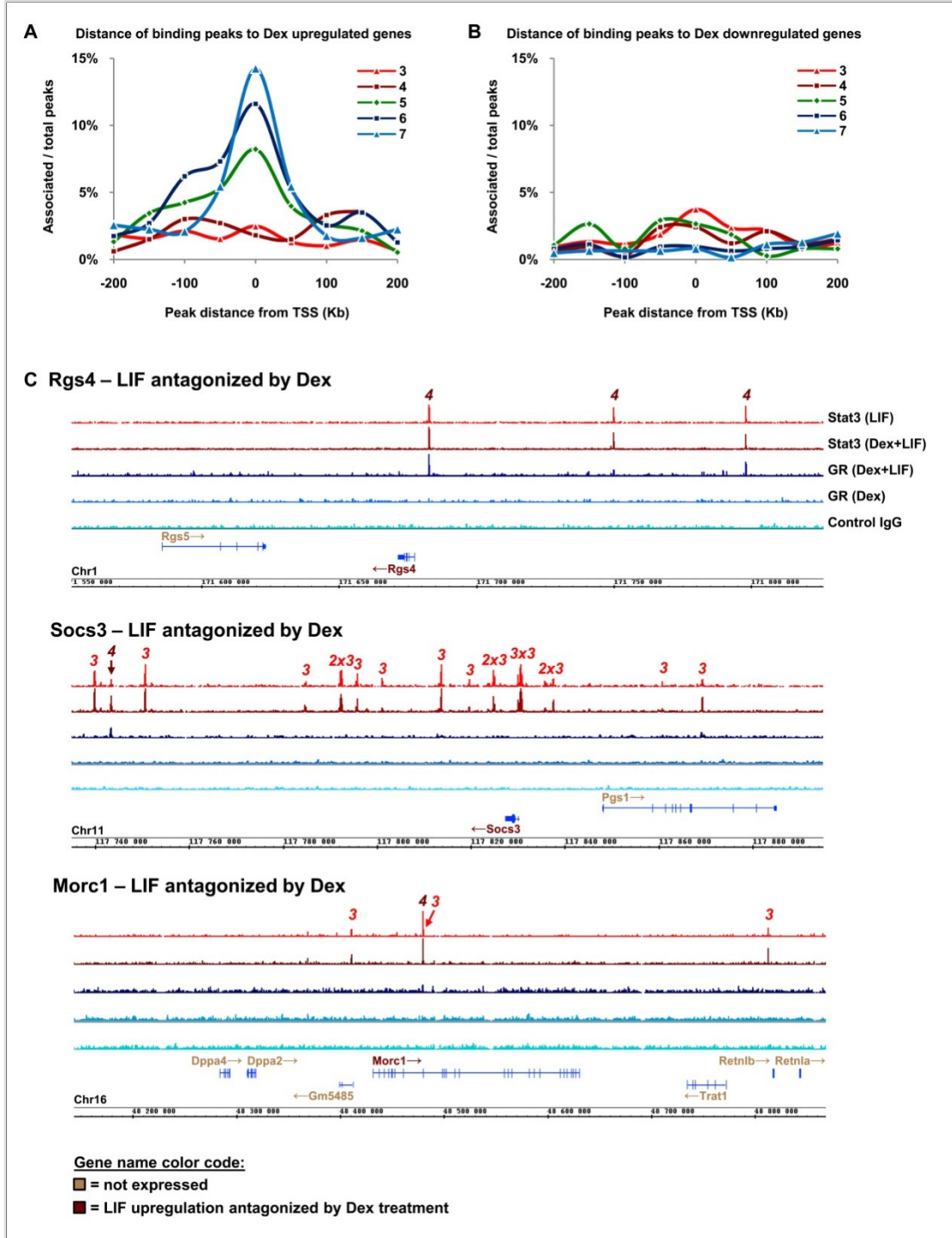
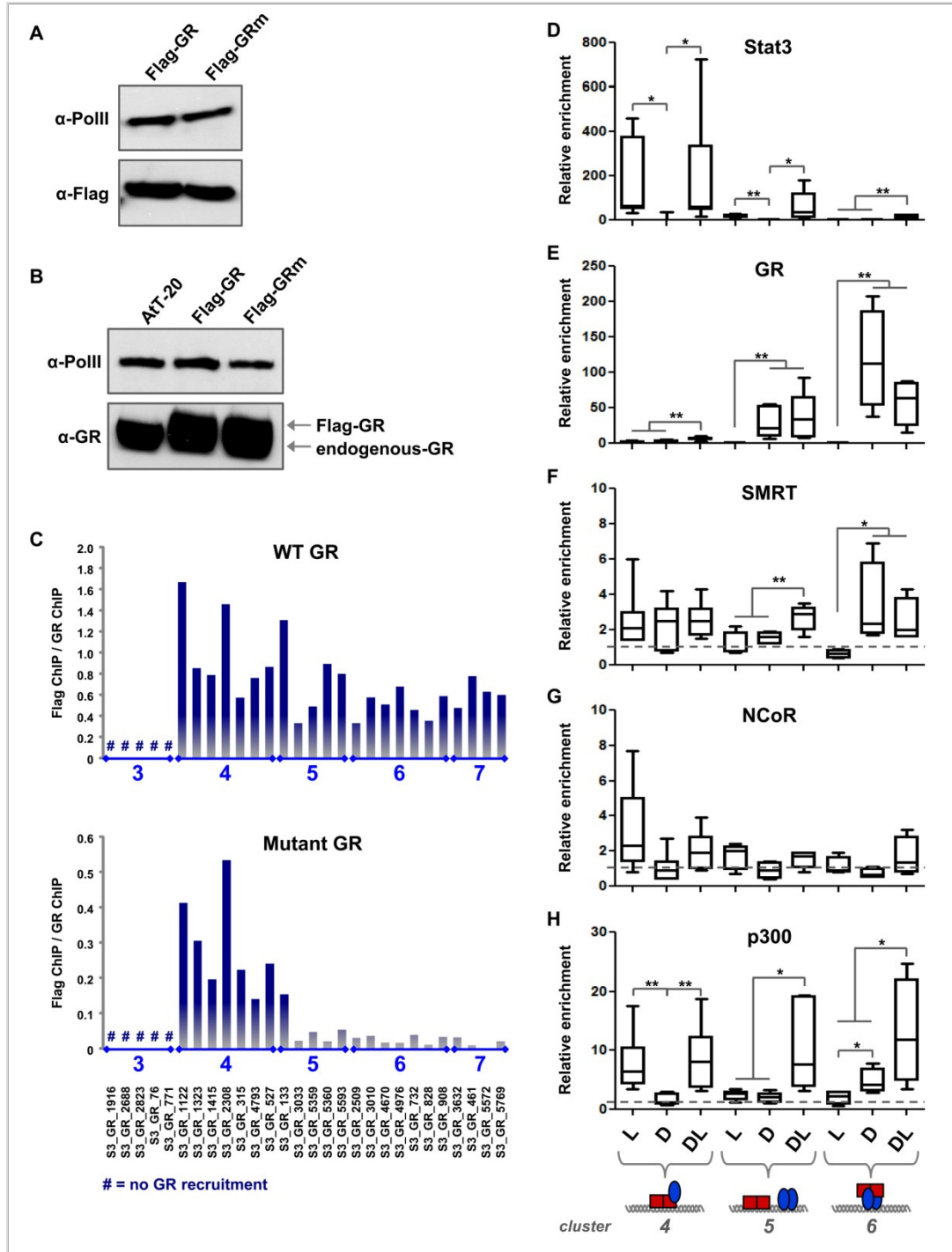
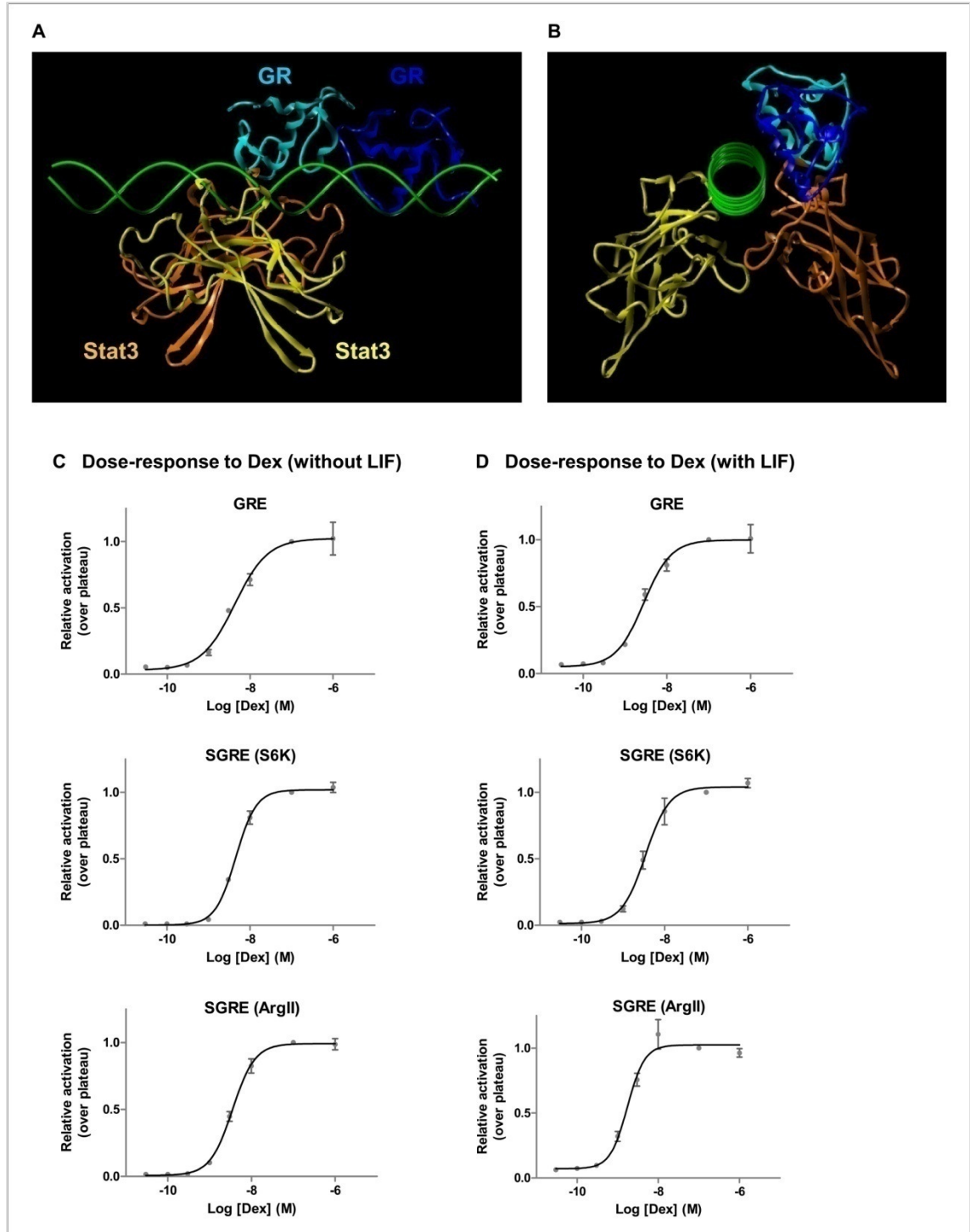


Figure 4.S3.: Distribution of Stat3 and/or GR binding peaks of each cluster type relative to TSS of associated Dex responsive genes.

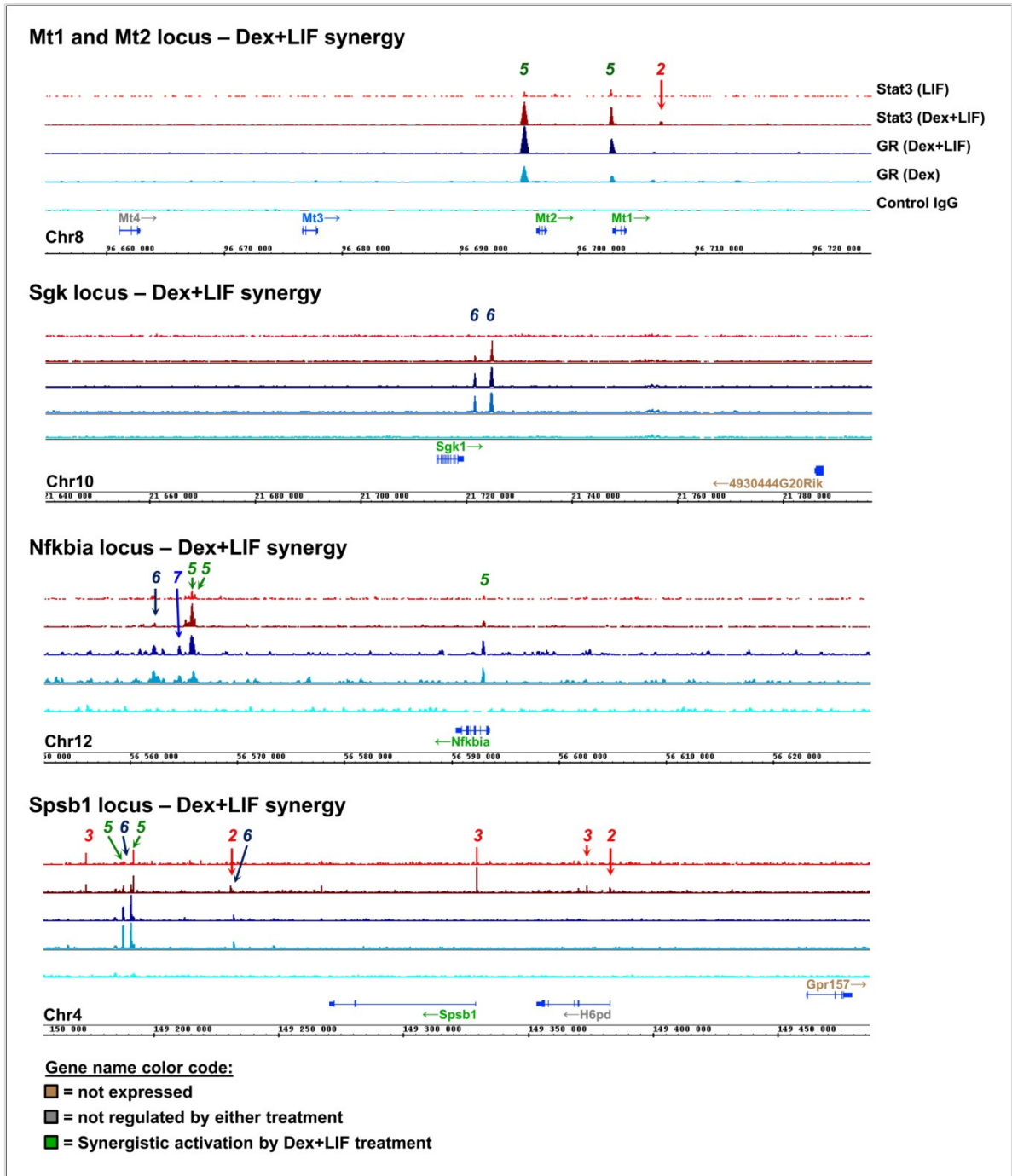


**Figure 4.S4.: Detailed analysis of AtT-20 cells stably expressing Flag-GR or mutant Flag-GR (Flag-GRm).**





**Figure 4.S5.: SGRE composite regulatory element binding and response properties.**



**Figure 4.S6.: ChIP-seq profiles for genes that are subject to synergistic activation by LIF and Dex treatment.**

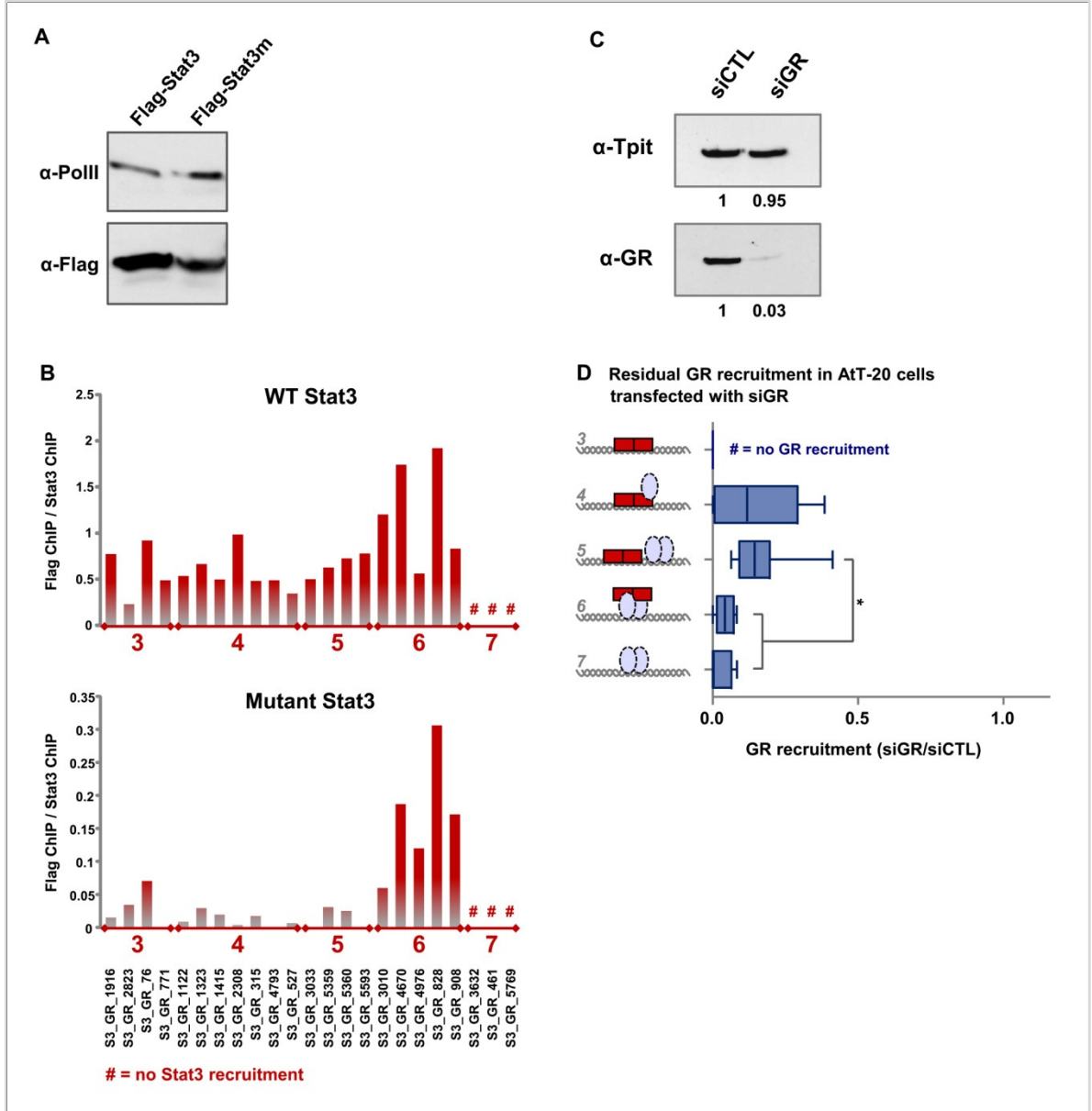


Figure 4.S7.: Detailed analysis of Stat3 tethering to GR.

#### 4.12. Supplementary References

1. Bailey,T.L., Williams,N., Misleh,C., and Li,W.W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* *34*, W369-W373.
2. Becker,S., Groner,B., and Muller,C.W. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* *394*, 145-151.
3. Crooks,G.E., Hon,G., Chandonia,J.M., and Brenner,S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* *14*, 1188-1190.
4. Kent,W.J., Sugnet,C.W., Furey,T.S., Roskin,K.M., Pringle,T.H., Zahler,A.M., and Haussler,D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* *12*, 996-1006.
5. Langmead,B., Trapnell,C., Pop,M., and Salzberg,S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* *10*, R25.
6. Meijnsing,S.H., Pufall,M.A., So,A.Y., Bates,D.L., Chen,L., and Yamamoto,K.R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* *324*, 407-410.
7. Roth,F.P., Hughes,J.D., Estep,P.W., and Church,G.M. (1998). Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat. Biotechnol.* *16*, 939-945.
8. Salmon-Divon,M., Dvinge,H., Tammoja,K., and Bertone,P. (2010). PeakAnalyzer: genome-wide annotation of chromatin binding and modification loci. *BMC Bioinformatics* *11*, 415.
9. Zhang,Y., Liu,T., Meyer,C.A., Eeckhoute,J., Johnson,D.S., Bernstein,B.E., Nusbaum,C., Myers,R.M., Brown,M., Li,W., and Liu,X.S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* *9*, R137.

## **Chapitre 5: Discussion et perspectives**

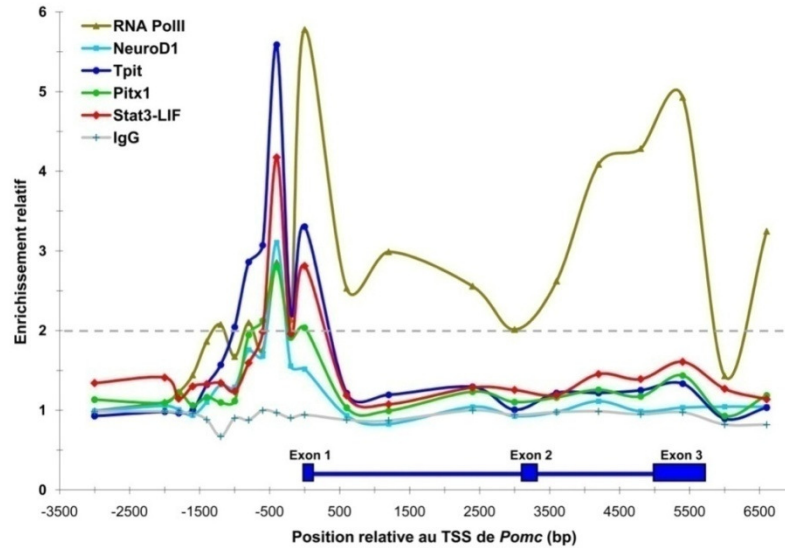
Les chapitres précédents ont permis d'explorer de nouveaux mécanismes de régulations intrinsèques à la cellule corticotrope (enhancer POMC, chapitre 2), mais pouvant également s'appliquer de façon générale à tous les types cellulaires en réponse à une combinaison de cytokines pro-inflammatoires et de Gc (réponse innée de défense cellulaire, chapitre 3 et la communication au niveau chromatinien entre Stat3 et GR, chapitre 3 et 4). Le chapitre qui suit tentera d'élaborer des hypothèses à partir des résultats novateurs présentés dans cette thèse et des résultats plus préliminaires, mais néanmoins intéressants, ayant été obtenus au cours de cette formation doctorale.

### **5.1. Contrôle transcriptionnel du gène de la POMC**

Notre laboratoire étudie depuis plus de 25 années le contrôle transcriptionnel de *Pomc* au niveau hypophysaire. Malgré cela nous découvrons encore aujourd'hui de nouveaux facteurs de transcription et cofacteurs impliqués dans la régulation de ce promoteur qui semble extrêmement encombré. Par exemple, nous avons récemment publié le recrutement du FT Etv1 au niveau du Tpit/PitxRE (274). Celui-ci agit en synergie avec Tpit sur cet élément pour induire la transcription de *Pomc*. Malgré une expression préférentielle dans les corticotropes au niveau du lobe antérieur, l'importance d'Etv1 *in vivo* reste toujours à démontrer. En effet, l'ablation d'Etv1 chez la souris n'influence pas la production d'ACTH, suggérant fortement une compensation par d'autres membres de cette famille (274). Le chapitre 2 identifie également un nouvel enhancer histospécifique de *Pomc* ayant une activité cortico-préférentielle. Cette découverte complexifie grandement notre interprétation du contrôle transcriptionnel de ce gène et ouvre beaucoup de nouvelles questions.

### 5.1.1. Contrôle de l'expression histospécifique

Tel que présenté au chapitre 1, le contrôle transcriptionnel histospécifique du promoteur *Pomc* est orchestré par la combinaison des FT NeuroD1, Pitx1 et Tpit. L'évaluation du recrutement de ces facteurs par ChIP-QPCR nous a permis de confirmer leur association avec la région promotrice qui avait été découverte par des études de transfection, de mutagenèse et de retard sur gel. Plus récemment, j'ai développé une puce d'ADN couvrant plusieurs loci d'intérêt pour notre laboratoire. Cette puce destinée à des expériences de ChIP contient plus de 4000 amplicons d'environ 1 kb permettant de couvrir 90 loci, en plus de fragments de 300 bp couvrant le locus *Pomc* avec une plus grande résolution (de -3000 bp à +6900 bp du TSS). L'hybridation de ChIP effectuées contre Tpit, Pitx1 et NeuroD1 sur ces puces maisons, ont également permis de confirmer grossièrement leur localisation au promoteur (Figure 5.1).



**Figure 5.1.: Profil d'enrichissement des ChIP-chip Tpiti, Pitx1, NeuroD1, Stat3 et RNA PolII sur le locus *Pomc*.**

Des ChIP contre l'ARN polymérase (RNA PolII), NeuroD1, Tpiti, Pitx1 et Stat3 (suivant une stimulation LIF) ont été hybridées, conjointement avec un échantillon témoin IgG, sur la micropuce à ADN Dj06 dont j'ai fait le design et qui a été produite par le service de biologie moléculaire de l'IRCM. Cette figure illustre la moyenne des ratios d'enrichissement obtenus pour au moins deux ChIP-chip indépendants. Le locus *Pomc* est couvert par des fragments de PCR contigus de 300bp. Le gène *Pomc* est représenté par une succession de boîtes (exons) et lignes (introns) bleues. Une ligne pointillée grise indique un niveau d'enrichissement significatif.

#### 5.1.1.1. NeuroD1

L'inactivation de NeuroD1 chez la souris, ne semble pas affecter de façon significative la différenciation des cellules corticotropes et l'expression de *Pomc* (275). Nous pensons que l'expression de NeuroD1 était perdue après la naissance, mais des marquages immunohistochimiques que j'ai fait m'indiquent que l'expression est maintenue chez l'adulte. Par contre, le marquage nucléaire attendu et observé au stade embryonnaire est remplacé par un marquage cytoplasmique (données non-publiées). Ceci pourrait indiquer qu'à l'âge adulte NeuroD1 est séquestré dans le cytoplasme en attente d'un signal activateur. Similairement, dans les cellules  $\beta$  productrices d'insuline du pancréas, NeuroD1 est envoyé au noyau par la voie de signalisation MEK-ERK en réponse au glucose (276). En plus de ce rôle dans la signalisation du glucose, la perte de NeuroD1 bloque la

différenciation des cellules  $\beta$  et les souris succombent de diabète néonatal (234). Ceci démontre que dans certains tissus NeuroD1 a une importance capitale. Néanmoins, l'ablation de NeuroD1 par shRNA abroge d'environ 50% l'expression de *Pomc* dans les AtT-20 (données non-publiées). De plus, la mutation de son site de liaison, la  $Ebox_{neuro}$ , inhibe presque complètement l'expression du gène rapporteur EGFP étant sous le contrôle de ce promoteur *Pomc* muté dans des souris transgéniques (231). Toutes ces évidences encouragent l'interprétation voulant que l'action de NeuroD1 soit redondante avec un autre facteur bHLH neurogénique dans les cellules corticotropes. Quant à elles, les cellules mélanotropes n'expriment pas NeuroD1, mais requièrent quand même la  $Ebox_{neuro}$  pour atteindre une expression adéquate de la *Pomc*. Le bHLH neurogénique Mash-1 (*Ascl1*) est un candidat potentiel de cette redondance. Premièrement, il est exprimé dans les corticotropes et les mélanotropes. L'ablation de Mash-1 chez la souris ne semble pas avoir de phénotype corticotrope ou mélanotrope ((277) et données non-publiées). Cependant, le double mutant NeuroD1/Mash-1 n'a pas été fait, donc son effet pourrait être masqué par la présence de NeuroD1. De plus, j'ai pu démontrer par immunoprécipitation de chromatine, la présence de Mash-1 au promoteur *Pomc* dans les AtT-20. Il serait très intéressant d'approfondir le rôle de Mash-1 dans la différenciation des corticotropes et dans le contrôle transcriptionnel de *Pomc*. Pour évaluer leur présence au promoteur et à l'enhancer *Pomc*, des ChIP Mash-1 et NeuroD1 pourraient être effectuées dans des cellules mélanotropes et corticotropes extraites par tri cellulaire à partir des souris transgéniques POMC-EGFP (231). De plus, il serait possible de transfecter des siRNA contre NeuroD1 et/ou Mash-1 dans les cellules AtT-20 pour jauger leur importance respective. Mais l'expérience de choix, serait évidemment de générer une souris ayant une invalidation conditionnelle de Mash-1 et NeuroD1 dans les cellules POMC hypophysaire grâce à notre lignée de souris POMC-Cre.

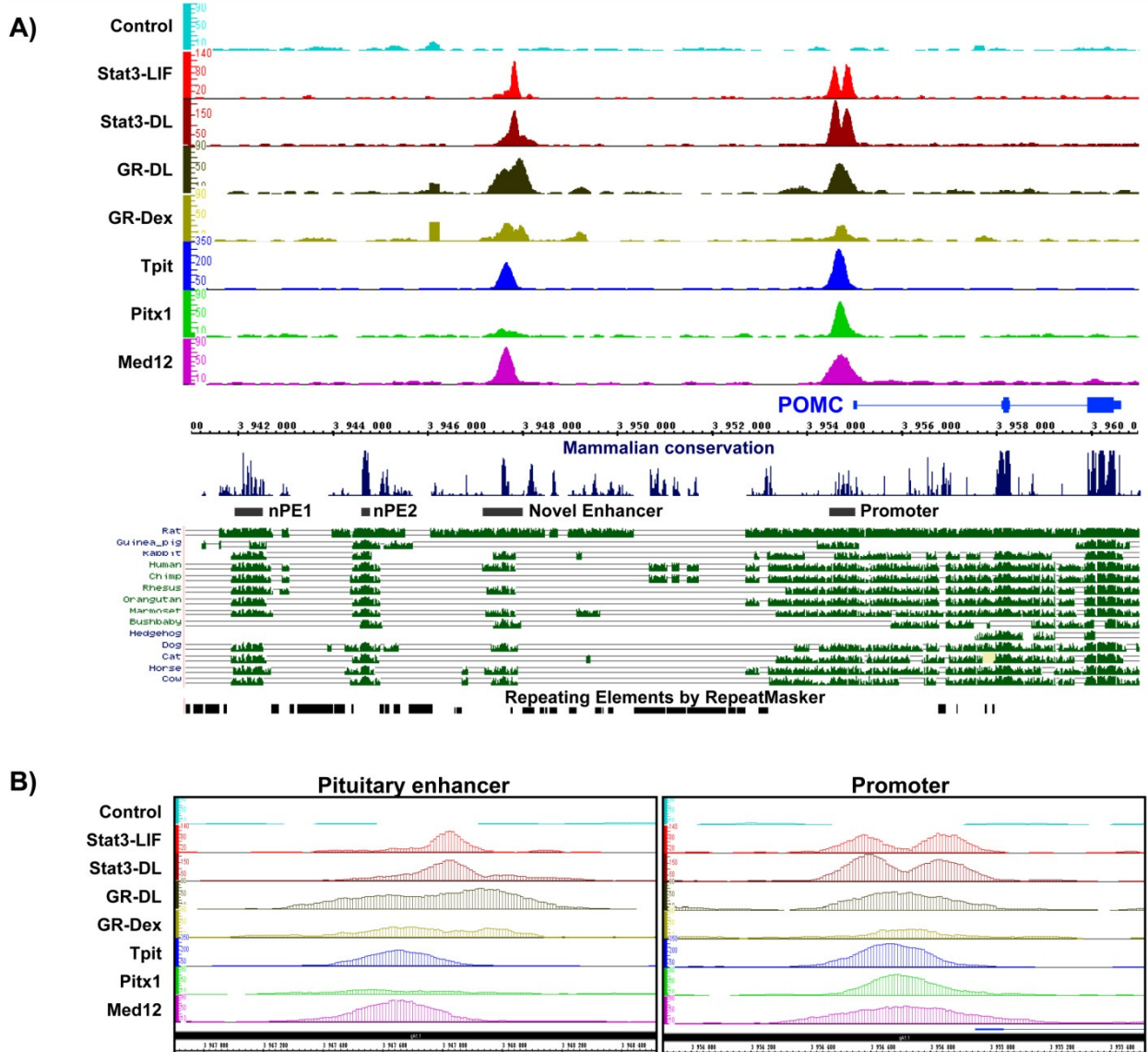
#### 5.1.1.2. *Pitx1* et *Tpit*

Les résultats que j'ai obtenus lors d'une récente expérience de ChIP-seq contre *Pitx1* dans les cellules AtT-20, nous confirment avec une incroyable précision que *Pitx1* est lié au



site Tpit/PitxRE du promoteur *Pomc* (Figure 5.2 et Table 5.1). De plus, nous pouvons observer son absence des autres régions du locus, hormis un léger pic non significatif à l'enhancer -7 Kb qui est vraisemblablement dû à la proximité entre l'enhancer et le promoteur grâce au repliement de la chromatine. Bien qu'aucune expérience de 3C (*chromosomal conformation capture*) n'ait confirmé cette interaction, plusieurs évidences le suggèrent fortement. Par exemple, le recrutement de la sous-unité Med12 du complexe médiateur (278;279) et de l'ARN Polymérase II à l'enhancer vont dans ce sens (Figure 5.1, 5.2 et 2.1). De plus, cet enhancer supplémente de façon importante l'activité transcriptionnelle du promoteur (Figure 2.2). Les caractéristiques et fonctions possibles de cet enhancer seront discutées plus loin.

Pitx1 aurait-il un rôle autre que celui d'apporter Tpit au promoteur? Nous savons en effet qu'en son absence, le monomère de Tpit lie très mal le Tpit/PitxRE, ce qui abroge dramatiquement l'activité du promoteur (Figure 2.3 et (13)). La comparaison de la séquence du Tpit/PitxRE à travers les espèces de mammifères indique une faible conservation de la partie recrutant Tpit, alors que la moitié mobilisant Pitx1 est conservée parfaitement (Figure 2.S2). L'imperfection du site Tpit affecte considérablement l'activité du Tpit/PitxRE et cette affliction est proportionnelle au nombre de changement de bases (Figure 2.7). Ainsi, l'activité du Tpit/PitxRE se décrit comme suit: Rat > Souris > Humain. Par contre, il est important de noter que ces expériences ont été faites dans un modèle cellulaire murin, donc il y aurait toujours une possibilité que les légères variations dans la séquence peptidique de Tpit à travers les espèces lui permette de s'adapter aux changements évolutifs du Tpit/PitxRE. Cette avenue pourrait être vérifiée facilement en répétant l'expérience de la Figure 2.7D, mais en comparant l'effet de la surexpression des Tpit de rat, souris et humain. Pour éviter qu'il y ait un biais de la spécificité d'interaction entre Tpit et Pitx en fonction des espèces dû à un phénomène de coévolution, la suppression de Pitx1 des différentes espèces pourrait également être envisagée.



**Figure 5.2.: Profil de ChIP-seq sur le locus *Pomc*.**

**A)** Alignement des profils de densité de séquences obtenus par ChIP-seq des facteurs indiqués dans les AtT-20. Les ChIP-seq Stat3 et GR sont issus du manuscrit produit au chapitre 4, tandis que j'ai produit les données Pitx1 et Med12 (non-publiées) et le profil de Tpit vient d'une ChIP effectuée par le Dr Konstantin Khetchoumian et que j'ai analysée (non-publié). Également représenté: la conservation de séquence entre les espèces de mammifères et la localisation des séquences régulatrices connues (nPE1 et nPE2 = enhancers hypothalamiques (220), enhancer hypophysaire identifié au chapitre 2 et le promoteur). **B)** Agrandissement des profils de ChIP-seq au niveau de l'enhancer hypophysaire et du promoteur.

Le profil de recrutement de Tpit par ChIP-seq (données non-publiées produites par le Dr Konstantin Khetchoumian et analysées par moi) confirment également très précisément les sites de liaison au niveau du Tpit/PitxRE du promoteur et du TpitREpal de l'enhancer (Figure 2.1 et 5.2). Je laisse à mon distingué collègue le soin de discuter, lors de publications à venir, de l'étendue du recrutement génomique de Tpit.

Dans un autre ordre d'idée, l'analyse préliminaire que j'ai pu effectuer des données de ChIP-seq Pitx1 dégage des questions intéressantes. J'ai identifié plus de 7000 sites de liaison de Pitx1 dans les AtT-20. La recherche de motifs *de novo* faite à partir de ces sites de liaison retrouve effectivement le motif de liaison connu pour les facteurs à homéodomaine de cette famille, soit TAATCC. Par contre, de façon surprenante, ce motif est très minoritaire et il est inclus dans des sites composites permettant le recrutement de facteurs comme Tpit et d'autres. La découverte la plus inattendue est celle d'un motif étant très surreprésenté (contenu dans plus de 90% des pics Pitx1): GGGGGa/tGGGG. Ce motif ressemble étrangement à un motif SP1, mais pour ce dernier la base centrale est normalement un C ou un G. La position privilégiée de ce nouveau motif au centre des pics de ChIP-seq Pitx1, favorise l'hypothèse qu'il s'agisse bien d'un site pouvant recruter directement Pitx1. Par contre, beaucoup de travail reste à faire pour le valider. Nous pouvons penser à une expérience de retard sur gel pour valider l'interaction directe entre Pitx1 et cette séquence. De plus, la suppression de Pitx1 devrait induire l'activité d'un rapporteur luciférase étant sous le contrôle d'un promoteur minimal jouté de cette séquence. De même, la mutagenèse de cette séquence devrait abolir son activité. L'identification des sites de liaison de Pitx1 s'est souvent avérée ardue sur des régions régulatrices répondant pourtant à Pitx1. Ainsi, très peu de sites de liaison de Pitx1 sont connus, vraisemblablement parce que les chercheurs tentaient d'identifier un élément de réponse du type TAATCC. Donc l'identification de ce nouveau site pourrait grandement faciliter l'étude du transcriptome régulé par Pitx1, de même que son impact au niveau développemental. Une publication datant d'une vingtaine d'années a identifié, dans le promoteur proximal du gène *HNF3 $\beta$*  (Foxa2), un site de liaison identique à ce nouveau

motif (280). De façon intéressante, ce site est essentiel à l'activité du promoteur, mais le FT responsable de cette activité demeure encore inconnu à ce jour. Le nouveau motif identifié par ChIP-seq, fait de Pitx1 le candidat tout désigné pour réguler ce promoteur.

### 5.1.2. Rôle de l'enhancer

Tel que le chapitre 2 et les profils de recrutement de ChIP-seq de la figure 5.2 le démontrent, l'enhancer recrute les mêmes facteurs qui sont important à l'activité du promoteur *Pomc*, à l'exception de Pitx1. De plus, l'expression d'un gène rapporteur EGFP sous le contrôle de cet enhancer dans des souris transgéniques nous a révélé qu'il détient une activité cortico-préférentielle. Celle-ci contraste et balance l'activité mélanopréférentielle du promoteur *Pomc*, tel qu'évaluée dans la même expérience et dans des travaux précédents (231). Cette caractéristique pourrait être d'une grande utilité pour notre laboratoire. Plusieurs travaux passés et en cours utilisent une lignée de souris transgéniques exprimant la *Cre recombinase* sous le contrôle du promoteur *Pomc* de rat, dans le but d'étudier la perte, principalement corticotrope, de gènes spécifiques grâce au système Cre/loxP (6;281). Par contre, la pénétrance de l'expression de la Cre dans les cellules corticotropes n'est que d'environ 70%, ce qui permet seulement une ablation partielle du gène ciblé. La création d'une lignée de souris transgénique exprimant cette enzyme sous le contrôle conjoint du promoteur et de l'enhancer *Pomc* de souris pourrait certainement accroître la pénétrance dans les corticotropes. De plus, lors de la conception de la construction servant à générer cette lignée, le cDNA de la *Cre* pourrait être couplé à un gène rapporteur fluorescent de type EGFP séparé par un IRES (*internal ribosome entry site*), afin de mieux suivre et caractériser l'expression du transgène *Cre*. Cette nouvelle lignée de souris constituerait un nouvel outil pour le laboratoire afin de mieux étudier l'ablation de gènes dans les cellules corticotropes.

Malgré la conservation variable du site Tpit inclus dans le Tpit/PitxRE, la conservation du TpitREpal de l'enhancer montre une conservation de séquence presque

parfaite à travers l'évolution des mammifères. Nous savons maintenant que la perte de conservation du Tpit/PitxRE affecte son activité (Figure 2.7) et puisque l'enhancer rehausse considérablement l'activité du promoteur en transfection (Figure 2.2), la forte conservation du TpitREpal suggère une importance de l'enhancer dans le contrôle du niveau d'expression de *Pomc in vivo*. J'ai tenté d'explorer cette avenue en générant des lignées de souris transgéniques exprimant stablement le gène rapporteur EGFP sous le contrôle de l'enhancer et du promoteur *Pomc*. Les différentes lignées obtenues (données non-publiées) confirment l'activité cortico-préférentielle de l'enhancer observée en souris transgéniques transitoires (Figure 2.6). Par contre, la comparaison du niveau d'expression du gène rapporteur (mesuré par RT-QPCR) en comparaison avec celui mesuré dans une lignée de souris transgénique stable exprimant la EGFP sous le contrôle du promoteur seulement (fait à partir du même plasmide de base) (231), ne permet pas de conclure sur l'action quantitative de l'enhancer. Ces mesures ont été faites tant chez l'adulte que chez l'embryon. Malheureusement, ce système semble trop artificiel pour permettre une évaluation quantitative. La solution la plus valable pour obtenir une réponse quant au rôle quantitatif de l'enhancer *in vivo*, serait de procéder à l'ablation de cette séquence. La souris KO ainsi produite nous permettrait de scruter de façon non biaisée et quantitative sa fonction développementale et à l'âge adulte.

Certaines espèces, selon les données disponibles actuellement, semblent ne pas avoir d'enhancer. Inversement, le lémurien *Bush baby* n'a pas la séquence promotrice. Tel que le démontre élégamment une publication récente effectuée chez la drosophile, l'expression des gènes à travers l'évolution est en partie maintenue grâce à la redondance des éléments de régulation (73). Donc, même si des éléments de réponse sont perdus, d'autres sont présents pour assurer l'expression. Également, la position et l'organisation des éléments de réponse peuvent considérablement varier en fonction des espèces, mais les réseaux régulateurs importants sont normalement conservés (282). Dans ce contexte, l'enhancer *Pomc* pourrait avoir un rôle important à jouer, soit pour compenser la perte d'activité du promoteur à cause des variantes dans la séquence du Tpit/PitxRE ou pour remplacer carrément le promoteur, possiblement comme chez les lémuriens.

Une fonction toujours incomprise de l'enhancer est son implication dans le contrôle de la réponse hormonale du locus *Pomc*. Le chapitre 2 (Figure 2.1) démontre bien que les FT permettant la réponse hormonale du promoteur sont également recrutés à l'enhancer en réponse à leur stimulus respectif: Nurr1 en réponse à la CRH, Stat3 en réponse à LIF et GR en présence de Gc. Par contre, lorsqu'il est transfecté dans les cellules AtT-20, l'enhancer ne répond que très minimalement à ces stimuli (Figure 2.2). La même expérience faite sur un rapporteur luciférase contenant le locus *Pomc* complet semble nous indiquer que l'enhancer n'ajoute rien au contrôle hormonal déjà efficacement orchestré par le promoteur. Pourquoi cet enhancer recruterait tous les FT nécessaires à la régulation hormonale sans toutefois l'influencer? Est-ce une question de contexte dans lequel les expériences ont été faites? Paradoxalement, l'enhancer humain contient des sites de liaison pour les mêmes FT, bien qu'ils soient organisés différemment, il est légitime de penser que les FT y sont recrutés. Par surcroît, en transfection, cet enhancer humain répond de façon similaire au promoteur humain face à des stimulations Gc et LIF, en plus d'avoir une réponse très exacerbée à la CRH. Cette forte réponse à la CRH est possiblement due à la prédiction de cinq sites de liaison (NBRE) pour les membres de la famille Nur. La mutagenèse de chacun de ces sites serait nécessaire pour pouvoir étayer une conclusion à ce sujet. Malgré ces importantes différences de réponse hormonale révélées en transfection, une question demeure: est-ce que l'enhancer participe à la réponse hormonale *in vivo*. Il serait très difficile de répondre à cette question chez l'humain, par contre il serait envisageable de la faire chez la souris. Toujours à l'aide d'une hypothétique souris KO pour l'enhancer *Pomc*, les différences de modulation de l'expression de *Pomc* entre ce KO et une souris WT pourrait être mesurées en réponse à des injections de cytokines pro-inflammatoires, de CRH, de Gc et même à des stress infectieux par l'injection de LPS.

Chez notre modèle de cellule corticotrope murine AtT-20, il nous a été impossible de confirmer ou d'infirmer un rôle de l'enhancer dans la régulation hormonale du gène endogène. Également, le contact direct entre l'enhancer et le promoteur n'a pas été démontré, bien que plusieurs évidences pointent en ce sens, comme le recrutement de

Med12 et PolII à l'enhancer. L'association d'autres sous-unités du complexe médiateur avec l'enhancer, de même que celle de la cohésine permettant de conservé la proximité entre deux régions génomiques (283), pourrait être évalué en CHIP afin de peaufiner la suggestion d'interaction entre le promoteur et l'enhancer. Par contre, l'expérience cruciale qui permettrait d'en faire la preuve hors de tout doute est le *chromosome conformation capture* (3C) (284). J'ai élaboré la stratégie permettant d'effectuer cette expérience, mais le temps m'aura manqué pour en venir à bout. Un nouveau membre de notre laboratoire y travaille présentement. Une fois au point et l'interaction promoteur-enhancer confirmée, cette expérience pourra être répétée sous différentes conditions de stimulation hormonale. L'hypothèse étant qu'en réponse aux facteurs hormonaux et au recrutement des FT ainsi activés, la fréquence d'interaction entre ces deux régions du locus soit modifiée. Des expériences préliminaires de CHIP de Med12, Med1 et cohésine en réponse à Dex et CRH abondent en partie dans ce sens. Des expériences supplémentaires sont à prévoir pour confirmer cette hypothèse, principalement le 3C.

### 5.1.3. Déficit isolé en ACTH

Le IAD est une maladie génétique grave et relativement rare. Tel que mentionné au chapitre 1, elle se caractérise par une absence de production d'ACTH qui est un signal essentiel dans la différenciation des cellules productrice de Gc dans le cortex surrénalien. Cette atteinte néonatale doit être diagnostiquée rapidement pour éviter la mort du nouveau-né. Le patient sera soumis à une thérapie de remplacement par des Gc synthétiques qui le suivra toute sa vie. Notre laboratoire a identifié la principale cause de cette maladie. En effet, environ 65% des patients ont des mutations dans le gène *TPIT*. Par contre, le ou les autres gènes causant le IAD néonatal demeurent toujours inconnus.

Puisque cette maladie est complètement restreinte à la cellule corticotrope, le gène *TPIT* demeure le candidat de choix. S'il n'y a pas de mutation affectant son épissage, sa traduction ou son activité, peut-être y a-t-il des mutations affectant les éléments de

régulation régissant son expression. Dans ce sens, notre laboratoire tente depuis plusieurs années d'identifier le promoteur de *Tpit*. Malheureusement, tous les essais sont demeurés vains jusqu'à maintenant, que ce soit en évaluant en transfection l'activité de la région en amont du TSS ou bien en transgénèse transitoire avec de grands pans (BAC) du locus *Tpit*. Plus récemment, les nouvelles techniques de génomiques nous ont permis d'explorer plus en détails ce locus. Les données de ChIP-seq obtenues pour Stat3, GR, Tpit, Pitx1 et Med12 nous ont mis sur la piste de régions pouvant potentiellement faire office de promoteur ou d'enhancer. Les régions les plus prometteuses sont actuellement en cours de clonage pour en évaluer l'activité. Celles qui auront des caractéristiques intéressantes, soit un bon niveau d'activité qui pourrait être couplé à une préférence d'expression dans les AtT-20 comparativement à des cellules hétérologues, pourraient être validées en transgénèse. Il nous sera également possible de vérifier s'il existe des mutations dans les TFBS importants à l'activité de ces éléments de régulation chez les patients IAD.

Une autre cause possible des IAD néonataux et/ou juvéniles pourrait être la défaillance des séquences régulatrices de *POMC*. Chez l'humain, le Tpit/PitxRE du promoteur semble avoir une activité plus faible que chez les rongeurs (Figure 2.7). En contrepartie, le TpitREpal de l'enhancer pourrait avoir un rôle majeure dans l'induction et le maintien de l'expression du locus. Nous avons effectué le séquençage du promoteur et de l'enhancer, autour des sites de liaison de Tpit, pour tous les patients pour lesquels nous n'avons pas identifié de mutations de *TPIT* ou seulement une mutation hétérozygote récessive. À ce jour, environ 30 patients ont été séquencés mais aucune mutation n'a été trouvée dans le Tpit/PitxRE ou le TpitREpal. Les nouveaux patients sont systématiquement séquencés pour la région codante de *TPIT* et pour les séquences régulatrices de *POMC*.

#### **5.1.4. Activation par LIF**

La réactivité du promoteur *Pomc* aux cytokines pro-inflammatoires de type LIF/IL6 est primordiale à la fonction de l'interface immuno-neuroendocrine. L'analyse du promoteur



de rat par divers groupes de chercheurs a identifié la région distale du promoteur comme étant le principal élément de réponse à LIF. En fait, lorsque Stat3 est activé par LIF, il est recruté sur le NurRE-STAT qui permet également le recrutement de Nur77 et le synergisme entre les voies LIF et CRH (268;269). La liaison de AP-1, dont le niveau protéique est rapidement augmenté en réponse à LIF et CRH, au niveau de l'exon 1 de *Pomc* participe également minoritairement à la réponse à LIF (269). Les études ayant caractérisées cette réponse ont procédé par délétions successives du promoteur, ainsi que par des mutations ciblées. Les conclusions se sont concentrées sur l'élément NurRE-STAT. En regardant avec précaution les données découlant de ces travaux, j'ai pu remarquer que la région proximale du promoteur répond aussi à LIF. Un article subséquent montre également que la région proximale (entre -166 et -96bp chez le rat) répond à LIF, mais ils n'observent pas de liaison de Stat1-3 en retard sur gel (265). Ils suggèrent donc que cette réponse soit attribuable à d'autres FT ou par un mécanisme de *tethering* de Stat3 sur un FT recruté dans la région, comme par exemple Sp1, sans toutefois explorer une de ces avenues. Mes premières données de CHIP-QPCR, CHIP-chip sur les puces maisons (Figure 5.1) ou sur les puces de génome complet (Figure 2.2B) ne semblaient pas attribuer un rôle à Stat3 dans cette activité. Néanmoins, l'incroyable augmentation de la résolution survenue avec l'avènement du CHIP-seq me permet maintenant d'émettre une hypothèse. Sur le profil de liaison de Stat3 on dénombre trois pics de liaison sur le locus *Pomc* (Figure 5.2). Le pic le plus en 5' nous confirme son recrutement à l'enhancer (285), mais de façon inattendue il y a deux pics au promoteur, l'un correspond au NurRE-STAT tandis que l'autre est inconnu. Ce nouveau pic se localise à la jonction des régions centrale et proximale du promoteur ayant démontrée une certaine réponse à LIF (265;269). L'analyse de la séquence sous ce pic (centré à -105bp en condition LIF et -115bp en condition Dex+LIF) identifie trois SBE possibles situés à -156bp, -125bp et -72bp, les trois étant conservés chez le rat. En tenant compte de la grande précision des pics au dessus des TFBS connus (Table 5.1), le site ayant le meilleur potentiel d'activité est celui à -125bp, mais à cause de leur proximité il serait utile de tous les étudier. Pour ce faire, la mutation de chacun de ces sites individuellement et en combinaison dans le contexte d'un rapporteur luciférase permettrait d'évaluer leur importance respective dans la

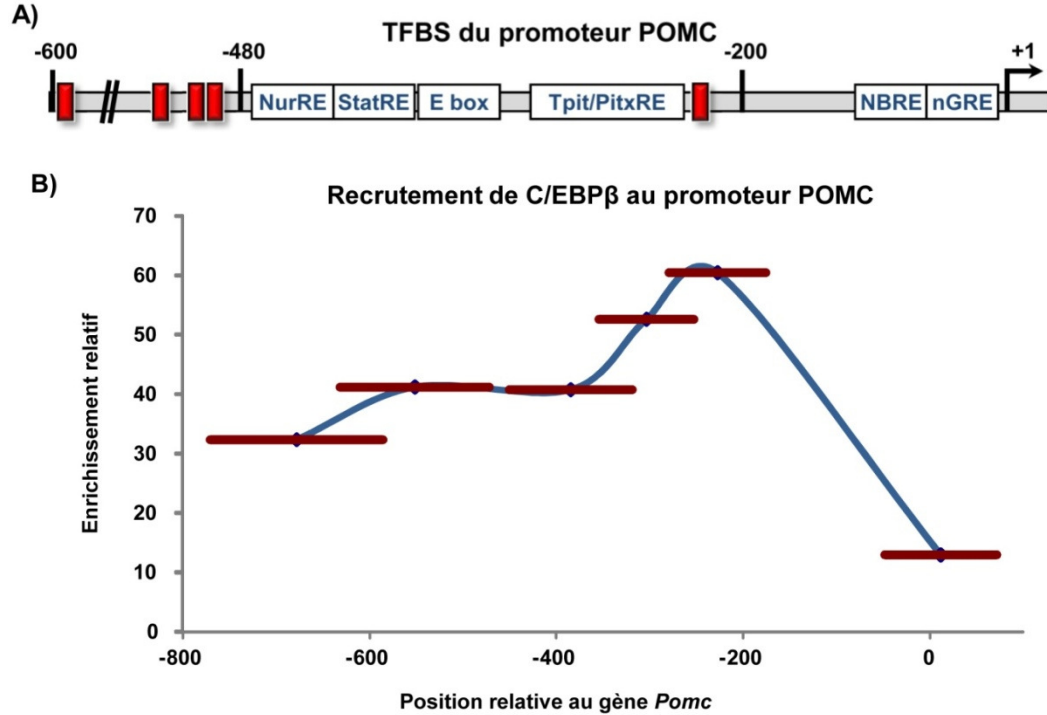
réponse du promoteur de souris à LIF, et potentiellement dans la synergie LIF/CRH. Cette synergie pourrait se faire grâce au recrutement de coactivateurs supplémentaires sur ces nouveaux sites et/ou par une interaction entre Stat3 et Nur77 étant recruté au NBRE situé tout près (Table 5.1). Dans ce contexte, il serait nécessaire d'évaluer l'importance du recrutement des Nur au NBRE du promoteur endogène, puisque toutes les expériences sur ce site ont été faites sur des rapporteurs luciféras. Théoriquement, il serait simple par ChIP-seq contre Nur77, NOR1 ou Nurr1 en condition CRH d'identifier s'ils sont liés uniquement au NurRE, ou également au NBRE, mais une limitation majeure existe. Aucun anticorps n'est d'assez bonne qualité pour procéder à cette étude. J'ai tenté de pallier à ce manque de réactif en générant des formes étiquetées de Nur77 (3xflag, V5/His et Myc) en N- et/ou C-terminal, pour ensuite faire la ChIP contre ces épitopes. Bien que les populations de cellules AtT-20 exprimant stablement ces chimères fonctionnelles produisent des niveaux protéiques semblables à l'endogène, aucune ChIP ne donnent d'enrichissement satisfaisant (données non-publiées). Il sera nécessaire de produire d'autres formes étiquetées de Nur77 ou de nouveaux anticorps contre les membres de la famille afin de répondre à cette question cruciale.

**Table 5.1.: Position des éléments de régulation et données de ChIP-seq pour le promoteur *Pomc***

TFBS	RAT	SOURIS	Centre du pic en ChIP-seq (souris)
NurRE	-404/-382	-378/-357	
StatRE	-387/-379	-361/-351	-355bp Stat3-DL
Ebox <sub>neuro</sub>	-375/-370	-350/-345	
TpitRE	-316/-309	-288/-282	-282bp Tpit
PitxRE	-302/-297	-276/-271	-276bp GR-DL -263bp Pitx1
Ebox <sub>ubi</sub>	-232/-227	-206/-201	
StatRE (possibles)	-183, -152 et -73	-156, -125 et -72	-115bp Stat3-DL
NBRE	-71/-64	-70/-63	
nGRE	-72/-59	-71/-58	
boîte TATA	-32/-27	-31/-26	
AP1	+39/+46	+39/+46	

Bien que la voie Jak-Stat soit le principal transducteur du signal LIF, le FT C/EBP $\beta$  peut également être activé. En effet, la stimulation LIF augmente la production de C/EBP $\beta$  et accroît son activation. En présence de LIF, la surexpression de C/EBP $\beta$  active de façon dose-dépendante l'activité du promoteur *Pomc* de rat (270). Par contre, cette étude n'a pas exploré les sites de liaison par lesquels C/EBP $\beta$  active le promoteur. Parallèlement, voyant que le NurRE-STAT n'est pas le seul élément, j'ai initié la recherche de FT étant possiblement impliqués dans la réponse du promoteur à LIF. L'analyse *in silico* du promoteur *Pomc* de souris révèle 5 sites de liaison potentiels pour des facteurs de type C/EBP (Figure 5.3A). Des expériences préliminaires de ChIP-QPCR m'ont permis d'observer le recrutement de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  au promoteur en condition basale, mais seul le recrutement de C/EBP $\beta$  est fortement rehaussé suite à une stimulation LIF (données non-publiées). Ce dernier devient donc le candidat le plus intéressant pour la suite. Pour tenter d'identifier le site de liaison privilégié par C/EBP $\beta$ , j'ai effectué des QPCR ciblant diverses régions du promoteur. Évidemment la résolution de cette expérience est loin de celle du ChIP-seq, mais le site localisé près du Tpit/PitxRE semble l'élément favorisé, sans

toutefois exclure une participation des autres sites potentiels (Figure 5.3B). Récemment, j'ai participé au clonage du promoteur *Pomc* de souris (-770bp à +71bp) en amont d'un rapporteur luciférase. Donc, pour évaluer la contribution de chacun de ces sites, il serait aisé d'en faire la mutagenèse dirigée individuellement et en combinaison. Également, pour mieux caractériser l'apport relatif de Stat3 et C/EBP $\beta$  à la réponse LIF, il serait possible de mesurer l'activation transcriptionnelle du gène endogène dans le modèle AtT-20 suite à une transfection avec des siRNA ciblés contre ces deux FT. Ces deux expériences seraient aussi l'occasion d'évaluer si C/EBP $\beta$  participe à la synergie LIF-CRH ou si elle ne dépend que de Stat3 et Nur77. En somme, la réponse du promoteur *Pomc* aux cytokines pro-inflammatoires de type LIF/IL6 est plus complexe qu'il ne l'avait été estimée au départ. Plusieurs FT y participent (AP1, Stat3 et C/EBP $\beta$ ), et ce sur divers éléments de réponse d'un promoteur déjà très encombré.



**Figure 5.3.: Recrutement de C/EBPβ au promoteur *Pomc*.**

**A)** Position des sites de liaison prédits sur le promoteur POMC de souris pour des facteurs de transcription de la famille C/EBP. **B)** Analyse du recrutement de C/EBPβ au promoteur par ChIP-QPCR suite à une stimulation LIF de cellules AtT-20 durant 30 min. Différentes paires d'oligonucléotides (barres rouges = amplicons) sont utilisés pour tenter d'identifier quels sites prédits recrutent effectivement C/EBPβ. L'enrichissement est normalisé par rapport à une ChIP témoin IgG et au promoteur de *MyoD* qui est complètement inactif dans ce type cellulaire.

### 5.1.5. Transrépression par les glucocorticoïdes

La complexité de l'activation transcriptionnelle de *Pomc* par LIF n'est rien comparativement à l'effet antagoniste exercée par les Gc. Tel qu'énoncé au chapitre 1, notre laboratoire a identifié deux mécanismes par lequel GR réprime le promoteur. Le premier fut la liaison d'un homo-trimère de GR sur le nGRE dans la région proximale (158). Par contre, il fut démontré plus tard que le mécanisme principal vient d'une transrépression de GR par *tethering* sur Nur77 (272). La sous-unité Brg1 du complexe Swi/Snf est essentielle dans la formation de ce complexe transrépresseur recrutant HDAC2 qui provoque la déacétylation

de l'histone H4 au niveau du promoteur et du gène. Mais contre-intuitivement, l'élaboration de ce complexe répresseur ne provoque pas le déplacement des coactivateurs TIF1 $\beta$  et SRC2 étant recruté en réponse à CRH (153;253). J'ai pu observer le même phénomène avec le coactivateur p300 recruté au promoteur et à l'enhancer en réponse à LIF (données non-publiées et chapitre 4). Tout comme les autres coactivateurs, le complexe médiateur n'est pas déplacé (données non-publiées). Donc, toutes ces données nous indiquent que l'arrivée de GR en réponse aux Gc, induit le recrutement nouvelles protéines formant un complexe répresseur, sans toutefois déplacer les coactivateurs. Ce statu quo est d'autant plus paradoxal qu'il y a une stabilisation de la liaison de certains coactivateurs, en condition Dex+CRH et/ou Dex+LIF, tel que pour p300. Le *tethering* de GR incitent peut-être des coactivateurs à changer leur fusil d'épaule, comme par exemple SRC2. Il a été démontré dans le contexte de la transrépression de GR sur AP1 que SRC2 passe d'activateur à répresseur (176). Il serait intéressant de voir si SRC2 joue un tel rôle au niveau du promoteur *Pomc*.

Lors de l'antagonisme Dex-CRH, la déacétylation de H4 est couplée à la perte d'induction de phosphorylation du queue C-terminale de l'ARN PolII sur les Ser2 et Ser5 corroborant une diminution de la polymérase sur le corps du gène *Pomc* (153). Par contre, plusieurs questions restent ouvertes. La diminution de l'ARN PolII activée est-elle la résultante d'une fermeture partielle du locus à cause de la perte des marques acétyles sur les histones H4? Cette hypothèse n'est vraisemblablement pas la meilleure, puisque le niveau de Ac-H4 ne fait que revenir à un état non-stimulé, permettant déjà une transcription élevée de ce gène. S'agit-il d'un phénomène de *pausing* de la polymérase? Pour approfondir cette éventualité, il serait intéressant d'analyser en ChIP-seq la position de la machinerie transcriptionnelle de base, de même que du complexe médiateur en fonction des différentes conditions hormonales. S'il s'agit de *pausing*, en condition Dex, l'ARN PolII et le complexe médiateur devraient générer un profil de ChIP-seq majoritairement centré après l'initiation du gène (environ à +20-50pb) (286-289). Des données préliminaires obtenues pour le complexe médiateur nous permettent d'abonder vers cette hypothèse, mais beaucoup de

travail reste à faire. Afin de confirmer le *pausing*, il serait également possible d'analyser la production d'ARNm tronqués. Ces petits ARNm sont produits lors du *pausing* par l'impossibilité de la polymérase de franchir un certain point lors de l'initiation de la transcription (286;289;290). Par surcroît, nous pourrions faire l'ablation par siRNA de DISF, un facteur étant recruté en tout temps à la polymérase et permettant d'induire ce phénomène de *pausing*. Sa perte devrait abroger la transrépression des Gc. Le recrutement constitutif de DISF à la polymérase n'induit pas toujours le *pausing*, les gènes ayant une transcription productive recrute le facteur P-TEFb pour contrer son action. Alors il serait aussi possible, d'évaluer en ChIP la perte de recrutement de P-TEFb au locus *Pomc* lors du traitement Dex. Cette perte devrait être concomitante à une diminution de la modification d'histone H3K79me2 sur les nucléosomes dans le corps du gène puisqu'elle est associée à une transcription active et donc au passage de la polymérase (291).

Nous savons également que la synergie induite par le co-traitement CRH+LIF est réfractaire à la transrépression par Dex (292). Est-ce parce que le recrutement de Stat3 et Nur77 au NurRE-STAT empêche le pont Nur77-Brg1-GR (sans toutefois bloquer le recrutement de GR au promoteur) et ainsi interfère avec la formation d'un complexe répressif? Est-ce à cause du recrutement de CREB avec Nur77 et Stat3? Une expérience de ChIP contre Nur77, Stat3, GR, CREB et Brg1 dans les différentes conditions hormonales permettrait de vérifier ces hypothèses. Par ailleurs, il a été montré dans les cellules ES que la liaison du FT c-Myc permet le recrutement de P-TEFb, libérant donc la PolII de cet arrêt forcé qu'est le *pausing* (291). Dans le contexte du promoteur *Pomc*, il est possible que c-Myc soit recruté à la Ebox<sub>neuro</sub> ou à la Ebox<sub>ubi</sub> en condition CRH+LIF, puisque qu'il lie ce type de séquences (293), permettant un recrutement accru de P-TEFb et l'antagonisme de la transrépression par GR.

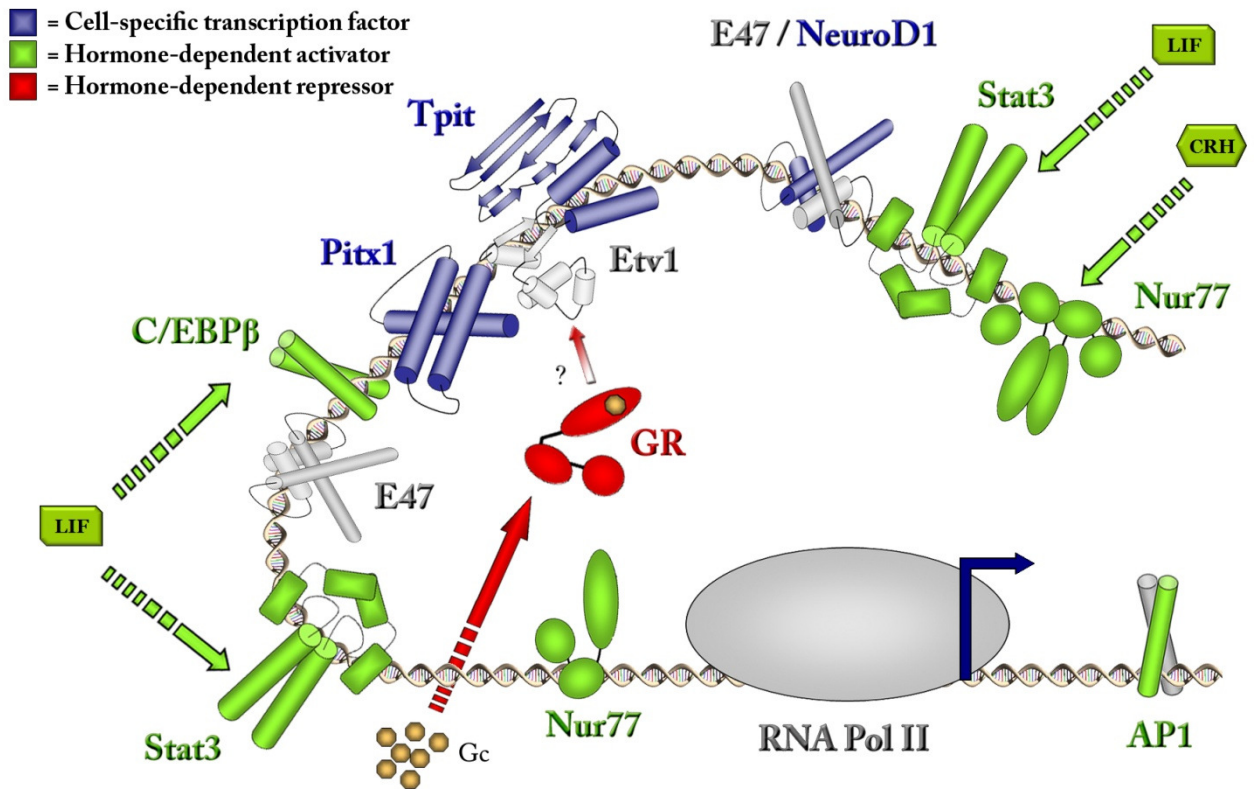
La méthylation de l'ADN est associée depuis longtemps à un état chromatinien répressif de longue durée. De plus en plus d'évidences nous indiquent maintenant qu'un processus de méthylation peut également être associé à de la répression transitoire. Par

exemple, en réponse aux estrogènes, les gènes *pS2* et *Wisp-2* subissent une activation qui est entrecoupée par le recrutement cyclique des méthylases de l'ADN Dnmt1, 3a et 3b qui à leur tour méthylent les cytosines de ces promoteurs (294). Un processus semblable pourrait être impliqué dans la répression de *Pomc*. Le recrutement de Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b en réponse aux différentes stimulations hormonales (LIF, CRH et/ou Dex) peut facilement être apprécié en ChIP-QPCR. Si leur présence est observée, la méthylation des îlots CpG du promoteur pourrait être mesurée par séquençage bisulfite ou par une ChIP à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les cytosines méthylées. Cette méthylation des îlots CpG pourrait ensuite permettre la répression de *Pomc* via le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine et de déacétylation d'histone Mi-2/NuRD via sa sous-unité MBD2 (*methyl CpG-binding domain*) (294;295). Supportant cette hypothèse, des données préliminaires recueillies par le laboratoire montrent que GR interagit avec certaines sous-unités du complexe NuRD.

Les données de ChIP-seq GR en condition Dex et Dex+LIF (chapitre 5 et Figure 5.2) sont intrigantes! Après une analyse minutieuse et plusieurs vérifications, le pic de liaison de GR au promoteur *Pomc* n'est pas localisé tel qu'attendu au dessus du NurRE, ni même du nGRE. Il est plutôt centré au dessus du Tpit/PitxRE (Figure 5.2 et Table 5.1). Il a déjà été montré que Tpit et/ou Pitx1 ne sont pas impliqués dans la répression par les Gc (272;273). Par contre, il est important de noter que ceci fut étudié sur des rapporteurs luciférases contenant le promoteur de rat. Peut-être est-ce différent sur le gène endogène ou chez la souris. Mais une hypothèse très intéressante serait de considérer le recrutement de GR par tethering sur Etv1 qui est intercalé entre Tpit et Pitx1 (274). En effet, GR est reconnu pour être capable de transréprimer un autre membre de la famille Ets, soit PU.1 (180). Il serait intéressant d'évaluer l'effet de siRNA contre Etv1 et Etv5, les deux membres de la famille Ets les plus abondants dans les AtT-20, sur la répression par les Gc. L'éventualité d'une interaction entre Etv1 et GR n'est pas en contradiction avec les contacts déjà décrits pour Nur77, Brg1 et GR. La position du pic de GR en ChIP-seq reflète vraisemblablement la position du complexe répresseur formé par GR.



En somme, l'importance relative des différents éléments réponses qui fut étudié dans le contexte plus artificiel de rapporteurs luciférase est remise en cause par l'analyse de la localisation précise de Stat3 et surtout GR par ChIP-seq. La figure 5.4 représente une version amendée (en comparaison à la figure 1.12) de la localisation majoritaire des FT en fonction des nouvelles données présentées dans cette thèse et des postulats émis dans cette discussion. L'organisation complexe des coactivateurs et corépresseurs n'est pas représentée, mais méritera d'être clarifiée puisqu'ils sont réellement les effecteurs des signaux transduit par Nur77, Stat3 et GR.



**Figure 5.4.:** Représentation amendée des facteurs de transcriptions impliqués dans le contrôle de l'expression histospécifique et hormonal de la *Pomc*.

## 5.2. Réponse innée de défense cellulaire

La réponse innée de défense cellulaire (ICDR, *innate cell defense response*) identifiée au chapitre 3 résulte de l'activation synergique d'un groupe de gènes par les cytokines pro-inflammatoires LIF/IL6 et les Gc. Bien que les Gc aient été historiquement reconnus pour leur actions anti-inflammatoires, cette découverte s'inscrit avec d'autres dans l'identification d'un rôle pro-inflammatoire et immuno-modulateur de l'immunité. En prenant du recul, il est logique de penser que les Gc ne peuvent que freiner le système immunitaire, puisqu'en situation de crise l'organisme doit impérativement se défendre contre l'agresseur. Donc, lors d'une infection majeure, tous les types cellulaires sont exposés de façon prolongée à LIF/IL6 et aux Gc, ce qui active la ICDR. Le seul tissu dans lequel je n'ai pu observer l'induction de cette réponse est le cerveau. Ma suspicion à l'effet que les hormones ou le LPS injectés intrapéritonéalement n'atteignent pas le cerveau à cause de la barrière hémato-encéphalique s'est confirmée puisque qu'une étude injectant le LPS directement dans le cerveau révèle l'activation d'un groupe de gènes similaire. De plus, l'activation de plusieurs de ces gènes est dépendante de l'activité de GR, suggérant qu'il s'agissent d'une réponse de type ICDR (296).

### 5.2.1. Réminiscence d'une réponse ancestrale

Plusieurs des gènes inclus dans cette réponse (Figure 3.S1) sont impliqués depuis très longtemps dans la défense contre les agresseurs. Par exemple, les gènes des familles Mx et Oas étant impliqués dans la défense contre les virus ont des gènes ancestraux chez le poulet, le poisson, *C. elegans* et même chez la levure (297;298). Il est donc possible que cette réponse soit un vestige de l'évolution, au moment où chacune des cellules devaient se défendre individuellement. Ceci n'est pas en opposition avec un rôle de cette ICDR dans nos organismes complexes. Dans une condition critique, il est important que tous les membres d'une communauté mettent l'épaule à la roue. Par exemple, la sécrétion locale de lipocaline 2 (Lcn2), un chélateur de fer, doit grandement aider à bloquer la prolifération bactérienne. Par contre, il est difficile d'évaluer l'importance de cette réponse par rapport à

la réponse immunitaire classique puisque cette réponse est activée par deux FT essentiels à la vie et qui ont plusieurs autres fonctions. Des outils pour y arriver pourrait découler de l'étude du mécanisme d'activation de cette réponse.

### 5.2.2. Mécanisme d'activation de la réponse innée de défense cellulaire

La réponse innée de défense cellulaire est activée par une synergie LIF/IL6 et Gc et donc par Stat3 et GR. Par contre, ces deux FT n'activent pas directement la majorité des gènes de cette réponse. En effet, tel que démontré à la figure 3.5E, un traitement cycloheximide (inhibant la synthèse protéique) abolit l'activation de la ICDR, indiquant qu'elle dépend de la production de médiateurs secondaires. En scrutant la liste des FT activés de façon synergique par un traitement LIF+Dex, j'ai identifié quelques FT ayant le potentiel de jouer ce rôle de médiateur (Figure 5.5A-B). De façon intéressante plusieurs d'entre eux ont déjà des fonctions immunitaires décrites. Par exemple, IRF9 (Isgf3 $\gamma$ ) forme un complexe transcriptionnel trimérique avec Stat1 et Stat2, nommé ISGF3, qui est essentiel à la réponse aux interférons de type I (IFN $\alpha$ - $\beta$ ) (299). De façon intéressante, la production de messagers de Stat1 et Stat2 est également activée en réponse à LIF et/ou Dex (Figure 5.5B). Quant à lui, IRF7 est également activé en réponse aux IFN de type I et directement par les antigènes viraux et bactériens via l'activation des récepteurs TLR (Toll-like receptor) (300;301). Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, son expression est régulée par ISGF3. Avec IRF3, il est essentiel à l'activation des gènes IFN de type I, de même que pour des gènes sensibles aux signaux IFN.

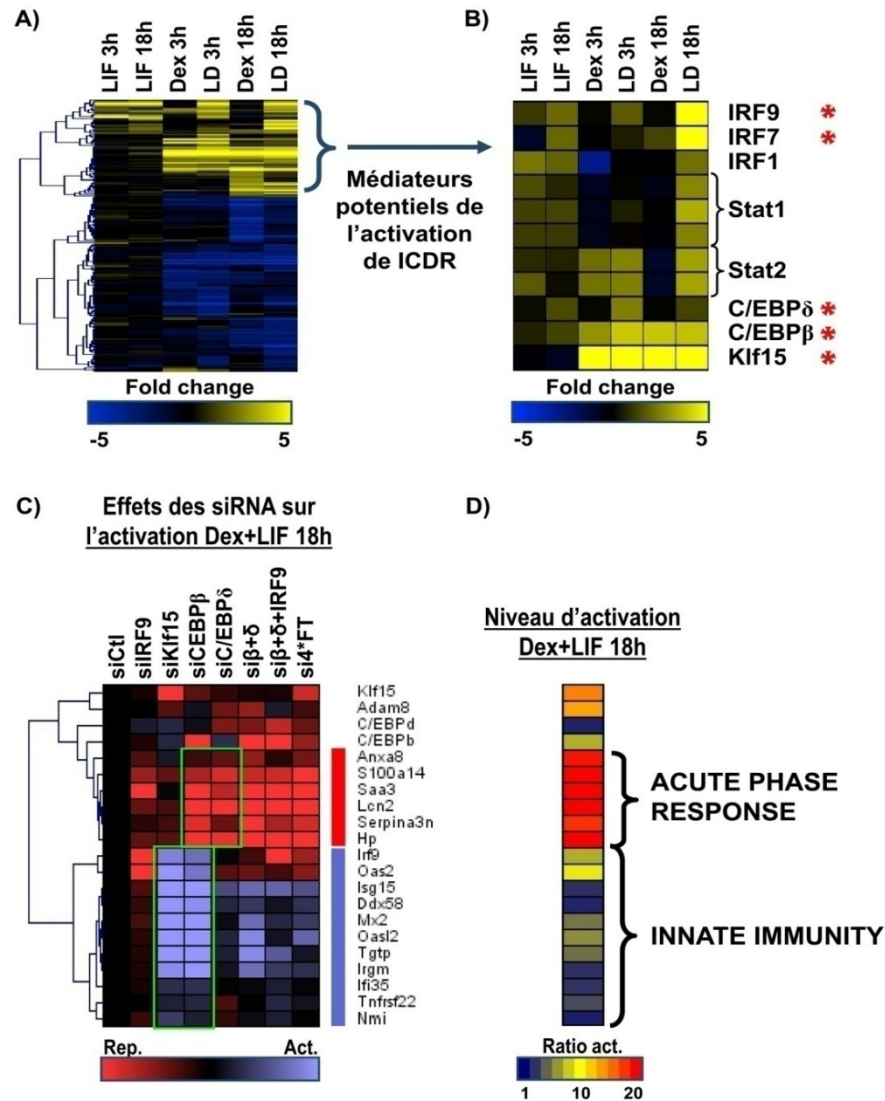
Les niveaux de C/EBP $\beta$  et  $\delta$  augmentent rapidement dans plusieurs tissus et de façon très marquée dans le foie suite à une injection LPS et par les cytokines pro-inflammatoires de type IL6 (302). Cette induction est en partie régulée par Stat3 (80;125). En résultante, ils sont des médiateurs importants de l'activation de l'*acute phase response* (125;302). Ces C/EBP ayant des fonctions tantôt redondantes et tantôt différentes, ont aussi des rôles importants dans le contrôle de la différenciation de plusieurs types cellulaires

(dont les lignées myéloïdes et les adipocytes) (303) et dans l'activation de divers processus biologiques tel que la prolifération, la lactation, la reproduction, le métabolisme énergétique, l'inflammation, etc. ((304) et revu dans (305)). De plus, C/EBP $\beta$  participe à l'activation de la transcription d'IRF9 en réponse à l'IFN $\gamma$  (306) et possiblement par d'autres signaux. Aussi, il est recruté synergiquement avec GR sur divers éléments de réponse communs, et ainsi participe à la différenciation des adipocytes (160). Une publication récente, démontre de façon élégante que C/EBP $\delta$  est essentiel à l'activation persistante de la réponse TLR4, mais pas à la réponse aiguë (307). Ceci est en accord avec l'hypothèse que j'expose dans cette section, à l'effet que C/EBP $\delta$  serait un médiateur d'une réponse à long terme.

Le membre de la famille Krüppel-like, Klf15, subit une forte induction en réponse à Dex (Figure 5.5B). Même si cette activation ne dépend pas de la présence de LIF, Klf15 demeure un candidat intéressant. Très peu de travaux ont été fait sur ce FT, mais il semble avoir des fonctions activatrices et répressives en fonction du contexte (308;309). Son rôle le mieux décrit réside dans la différenciation des adipocytes induite par les Gc. En effet, l'expression de Klf15 est rapidement accrue par les Gc dans les préadipocytes et son ablation par siRNA abroge presque complètement l'expression des gènes marqueurs de l'adipogenèse et l'accumulation de lipides (310;311).

Afin d'évaluer la possibilité qu'un ou plusieurs de ces FT soient impliqués dans l'activation de la ICDR, j'ai transfecté les cellules AtT-20 avec des siRNA spécifiques contre chacun d'eux préalablement à un traitement Dex+LIF de 18h. La difficulté de cette approche vient du fait qu'il nous faille bloquer l'augmentation de la transcription de ces FT et non seulement leur niveau basal. Néanmoins, pour la majorité d'entre eux je parviens à contrecarrer efficacement cette induction. La figure 5.5C représente l'effet des différents siRNA sur l'activation de plusieurs gènes de la ICDR choisis au hasard. Une analyse de regroupement non-biaisé ségrège ces gènes en deux groupes. Le premier (rouge) semble principalement activé par C/EBP $\beta$  et  $\delta$ . Bien qu'aucun des FT testés ne semble activer le

second groupe, il semble être sous un contrôle répressif de *Klf15* et *C/EBPβ* (Figure 5.5C). Cet effet de *C/EBPβ* pourrait découler de sa capacité d'induire la transcription du gène *Klf15* (311). L'ablation d'IRF7 par un siRNA spécifique fut efficace, mais n'a affecté l'activation d'aucun des gènes vérifiés (données non-publiées). De façon intéressante, le niveau d'activation des gènes en réponse au traitement Dex+LIF 18h s'avère très différent entre les deux groupes: le premier ayant de fortes activations (Figure 5.5D). De plus, le premier groupe comprend des gènes normalement attribués à la réponse APR, tandis que le second représente des gènes de l'immunité innée. Il est extrêmement captivant d'observer que les deux groupes de gènes (APR et immunité innée) constituant l'ICDR soient contrôlés par des médiateurs secondaires différents. Ces résultats préliminaires pavent la voie vers la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'activation de l'ICDR, mais beaucoup de travail doit encore être accompli. Lorsque le ou les médiateurs secondaires seront clairement identifiés, il sera possible d'évaluer l'importance relative de l'ICDR dans la réponse de défense immunitaire globale. L'utilisation de modèles de souris dans lesquels ce(s) gène(s) seront invalidés conditionnellement dans certains tissus, nous aidera sans doute à atteindre ce but. Par contre, il faudra être prudent d'utiliser les modèles appropriés puisque, tel que discuté plus haut, certains de ces facteurs sont importants dans l'APR et/ou la défense immunitaire innée.



**Figure 5.5.: Analyse préliminaire des médiateurs secondaires potentiellement responsables de l'activation de l'ICDR.**

**A)** Dendrogramme illustrant la régulation d'un sous-groupe de 176 gènes associés au contrôle transcriptionnel extraits à partir des données du chapitre 3. **B)** Dendrogramme représentant le profil d'activation en réponse à LIF et/ou Dex pour les FT étant potentiellement impliqués dans l'activation de l'ICDR. **C)** Analyse de regroupement non-biaisé de l'effet des siRNA dirigés contre les FT étant potentiellement responsable de l'activation de l'ICDR. Une coloration rouge indique une diminution de l'activation par rapport à l'activation normale par le traitement Dex+LIF 18h tel que mesurer par RT-QPCR. Inversement, la coloration bleue souligne une activation accrue. Deux groupes de gènes se distinguent, ils sont indiqués par les barres rouges et bleues. **D)** Activation des gènes tel que mesuré par RT-QPCR suite à un traitement Dex+LIF 18h par rapport à un traitement par le véhicule seulement.

### 5.3. Les différentes chorégraphies du couple Stat3-GR

Une étude récente (312) a fait la comparaison du recrutement de GR en ChIP-seq dans 2 types cellulaires: les AtT-20 et des cellules de glandes mammaires (3134). Les auteurs ont également comparé les profils de recrutement de GR avec des expériences de DNaseI-seq avant et après un traitement avec la Dex. À l'instar de mes résultats, ils confirment que GR n'est pas recruté à l'ADN en absence de stimulation. Comme plusieurs expériences de profilage d'expression le suggéraient, le catalogue de site de recrutement de GR varie beaucoup d'un type cellulaire à l'autre; seulement 10% des sites GR dans les AtT-20 sont également retrouvés dans les 3134. Cette différence entre les types cellulaires est due principalement à l'accessibilité des sites avant la stimulation Dex. En effet, environ 95% des séquences recrutant GR étaient sensibles à la DNaseI avant la stimulation. Ce qui est paradoxal, mais qui appuie mes résultats: moins de la moitié de ces séquences préalablement ouvertes contiennent un GRE canonique, alors que les sites dont la chromatine semble ouverte par GR en contiennent pratiquement tous. Par contre, le mécanisme par lequel GR peut ouvrir la chromatine (agir à titre de facteur pionnier) est toujours incompris.

Dans une étude subséquente, le même groupe a comparé le profil de liaison de GR et de AP-1 (313). Alors que la grande majorité des sites de liaison de AP-1 sont indépendant de la stimulation Dex et surviennent dans des zones de chromatines sensibles à la DNase I, environ 50% des sites recrutant GR co-localisent avec AP-1. L'expression d'un dominant négatif de Fos (A-Fos) empêche la liaison de AP-1 à l'ADN et la résultante est une fermeture de la chromatine. Cette fermeture de la chromatine aux sites co-recrutant AP-1 et GR, provoque la perte de liaison de GR. L'expression de A-Fos interfère avec 48% des gènes normalement régulés par la Dex dans ce type cellulaire, tant les gènes activés que réprimés. Si on se réfère aux articles ayant étudié des loci spécifiques, il semble que le co-recrutement à l'ADN de AP-1 et GR (induisant une synergie) et le *tethering* de GR sur AP-1 (provoquant une transrépression) soit très répandus à l'échelle du génome. Bien que ce groupe le suggèrent, ils n'ont pas démontré formellement qu'une partie des sites de

recrutement de GR passent par un recrutement protéine:protéine. Néanmoins, tel que démontré dans le chapitre 4 avec Stat3, le recrutement par *tethering* sur d'autres FT semble être un mécanisme privilégié par GR. Par recherche *in silico* (Figure 4.S1), j'ai identifié des motifs de liaison de FT qui sont enrichis sous les pics de Stat3 et/ou GR. La majorité des facteurs associés à ces motifs ont été associés à la transduction transcriptionnelle en réponse à des signaux. Certains semblent avoir une préférence pour les sites Stat3 (SP1), d'autres pour les sites GR (CREB et AP-1) alors que d'autres sont enrichis dans les deux catégories (Fox et bHLH). Le groupe de Gordon Hager a également retrouvé ce genre de motifs associés aux pics GR (AP-1, NF- $\kappa$ B, Fox, bHLH) (312).

La combinaison de réponses apportée par ces deux articles récents et le chapitre 4 de cet ouvrage ouvre des pistes de solution, mais également d'autres questions. Tentons d'en extraire les généralités. Premièrement, GR lie majoritairement des sites chromatinien préalablement accessibles. Cette accessibilité est orchestrée de façon cellule-spécifique par divers facteurs de transcription, tel que AP-1 dans le cas présent. D'autres exemples de facteurs pionniers permettant l'accessibilité pour les récepteurs nucléaires existent dans la littérature. Nous n'avons qu'à penser à FoxA1 pour ER $\alpha$  (314;315), à C/EBP $\alpha$  pour PPAR $\gamma$  (316) et à PU.1 pour LXR (317). Dans les cellules corticotropes, nous pourrions penser à AP-1, à Fox, à des bHLH ou même à CREB comme facteurs pionniers de GR. Dans ce registre, le statut de Stat3 est moins clair. Lie-t-il majoritairement des sites accessibles? Les données actuelles ne nous permettent pas de l'affirmer. Par contre, le fait que Stat3 lie des milliers de sites sans avoir d'effet transcriptionnel et qu'il potentialise l'action des Gc me permet de spéculer qu'il pourrait agir à titre de pionnier dans certains cas. Une expérience de DNaseI-seq avant et après traitement LIF nous permettrait de répondre à cette question.

D'autre part, tous les sites de liaison de Stat3 étant inactifs, du moins en apparence, pourrait être impliqués dans la régulation de gènes n'étant pas inclus dans la version de micropuce à ADN que j'ai utilisée pour l'analyse du transcriptome. Ils pourraient aussi réguler l'expression de miRNA ou d'autres type d'ARNs. Une autre possibilité serait que



Stat3 soit capable de lier tous ces sites, mais que sa fonction activatrice soit réprimée. Suite à une stimulation  $\text{IFN}\gamma$ , Stat1 se lie au promoteur IRF8 pour l'activer. Il est également connu que l'expression d'IRF8 est inversement proportionnelle au niveau de méthylation de son promoteur. Subséquemment, il a été montré que même lorsque le promoteur IRF8 est méthylé, Stat1 y est recruté sans toutefois en provoquer l'induction (318). Les auteurs expliquent cette absence d'activation par l'état méthylé des îlots CpG qui permet le recrutement d'un complexe répresseur contenant PIAS1 (un inhibiteur reconnu de Stat1) et MBD1 (methyl-CpG binding domain protein 1). Le promoteur IRF8 devient activable par  $\text{IFN}\gamma$  suite à une ablation de MBD1 par un siRNA (318). Un mécanisme semblable pourrait être facilement envisageable afin de contrôler le signal potentiateur de LIF/Stat3 et donc réprimer des milliers de sites n'ayant pas à être actif dans un contexte donné.

Dans la même veine que l'interaction entre les voies LIF/IL6 et Gc, les autres sites Stat3 pourraient être la cible de *tethering* ou agir à titre de facteur pionnier pour d'autres voies de signalisation. Dans le contexte de la cellule corticotrope, il serait intéressant de juxtaposer le profil de liaison des facteurs Nur activés par une stimulation CRH à celui de Stat3 (LIF et LIF+CRH). Puisque Nur77 et Stat3 agissent en synergie au promoteur *Pomc* grâce à un site composite (NurRE-STAT) et que plusieurs récepteurs nucléaires sont capables de *tethering*, il y a fort à parier que les voies LIF et CRH coopèrent et s'influencent au niveau transcriptionnel.

Le recrutement de GR par *tethering* est un mécanisme général d'action, il en va de même pour Stat3. L'effet transcriptionnel de ce type de recrutement varie en fonction des FT; Stat3 transactive, alors que GR transréprime. Dans le but de mieux comprendre l'interrelation entre les voies LIF/IL6 et Gc dans les cellules corticotopes, il serait intéressant d'ajouter des expériences de CHIP-seq pour d'autres FT dans des conditions où les deux voies sont activées. Les FT étant également activés par la signalisation LIF seraient particulièrement intéressants: AP-1 (Jun/Fos), C/EBP $\beta$  et NF- $\kappa$ B. La prédiction

étant que GR module l'action de ces FT par *tethering*, puisqu'une petite proportion de sites de recrutement de GR ne contiennent ni de GRE ni de SBE.

Dans le cas de la transrépression par *tethering* de GR sur Stat3, nous avons tenté d'identifier un ou des cofacteurs responsables de cet effet. L'évaluation du recrutement des deux corépresseurs les mieux connus, NCoR et SMRT, ne nous indique pas de recrutement accru sur ces sites de *tethering* en condition Dex+LIF (Figure 4.S4F et G). Par ailleurs, il n'y a pas de diminution de recrutement du coactivateur p300 sur ces même sites (Figure 4.S4H). Dans le but d'approfondir notre compréhension de l'effet transrépressif général de GR, il serait utile d'évaluer par ChIP-QPCR l'apparition de recrutement de certains autres corépresseurs notoires, comme par exemple HDAC2 essentiel à la transrépression de *Pomc* (153). L'action bivalente de SRC2 (GRIP1) est également à considérée, mais sera plus difficilement interprétable. Il faudra utiliser des mutants de SRC2 capables de transactivation ou de transrépression seulement. Le recrutement du complexe NuRD et des Dnmt pourrait également être examiné.

La combinaison du recrutement de Stat3 et GR directement à l'ADN, induit une synergie transcriptionnelle. Ce co-recrutement concomitant provoque également une synergie de liaison. Il reste toujours à déterminer si ces effets synergiques sont dus à une stabilisation du complexe transcriptionnel, à cause de l'interaction entre Stat3 et GR ou par l'action des cofacteurs comme CBP/p300, les deux n'étant pas mutuellement exclusifs. Il serait intéressant d'étudier le recrutement de Stat3 et de GR en réponse à une cinétique de stimulation par LIF et/ou Dex pour voir si la durée de leur présence est accrue et ainsi répondre à la première hypothèse. Pour tester la seconde, il serait envisageable d'évaluer la liaison de Stat3 et de GR suite à l'ablation de différents cofacteurs à l'aide de siRNA.

Les chapitres 3 et 4 nous montrent à quel point les cytokines pro-inflammatoires LIF/IL6 et les Gc s'influencent mutuellement, tant au niveau transcriptionnel primaire grâce l'action concertée de Stat3 et GR, mais également via l'activation de médiateurs secondaires

qui permettent l'activation d'un mécanisme inné de défense. Ces signaux autrefois considérés comme antagonistes, sont maintenant réconciliés et nous comprenons beaucoup mieux comment ils interagissent.

## 5.4. Conclusions générales

La cellule corticotrope hypophysaire constitue un rouage essentiel à la réponse de l'organisme face aux divers stress. Sa position centrale dans l'interface immuno-neuroendocrine n'a d'égale que sa réactivité aux signaux afférents que sont les cytokines pro-inflammatoires LIF/IL6 et les Gc surrénaliens. Cette cellule constitue donc le modèle idéal pour étudier les interrelations entre ces voies de signalisation. Les travaux de génomique présentés dans cet ouvrage m'ont permis de découvrir un enhancer impliqué dans l'expression cortico-préférentielle de la *Pomc*. La forte activité de cette séquence régulatrice dépend du premier site de liaison pour un facteur à boîte T, en l'occurrence Tpit. Cet enhancer hautement histospécifique nous permettra de développer des outils permettant une étude ciblée des cellules corticotropes, mais surtout de mieux comprendre l'expression développementale et hormonale de la *Pomc*. À long terme, cet élément permettra peut-être d'expliquer certaines pathologies associées à des déficiences corticotropes partielles ou complètes. Pour approfondir l'étude de cet enhancer, il sera nécessaire d'en faire l'ablation complète dans un modèle de souris et d'en faire le séquençage systématique chez les patients IAD dont la condition n'est pas expliquée par une mutation dans le gène *TPIT*.

L'induction concomitante des voies de signalisation reliées à LIF/IL6 et Gc provoque l'activation des facteurs de transcription Stat3 et GR, respectivement. Dans le champ de bataille qu'est le génome, ils ne sont pas qu'ennemis; plus souvent qu'autrement ils collaborent. Cette thèse démontre que le *tethering* de GR sur Stat3 provoque la transrépression. Inversement, le *tethering* de Stat3 sur GR résulte en une synergie transcriptionnelle. Parallèlement, le co-recrutement de Stat3 et GR sur des sites contigus ou même composites induit de la synergie. L'aboutissement de ces actions synergiques entre les voies LIF/IL6 et Gc est l'induction d'une réponse innée de défense cellulaire par tous les types cellulaires. Au final, cette cellule corticotrope fut la pierre angulaire de la découverte d'une réponse innée de défense cellulaire et de mécanismes transcriptionnels pléiotropiques résultant d'une chorégraphie finement orchestrée par l'action commune Stat3 et GR. La compréhension de ces interrelations permettra de mieux déchiffrer les maladies

inflammatoires et métaboliques qui affligent nos sociétés modernes, en plus d'orienté le développement de nouvelles thérapies contre ces affections.

## 6. Bibliographie

1. **Charles MA, Suh H, Hjalt TA, Drouin J, Camper SA, Gage PJ** 2005 PITX Genes Are Required for Cell Survival and Lhx3 Activation. *Molecular Endocrinology* 19:1893-1903
2. **Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H** 1997 Multistep Control of Pituitary Organogenesis. *Science* 278:1809-1812
3. **Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhold IJP, Mendonça BB, Brue T, Camper SA** 2010 Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 323:4-19
4. **Raetzman LT, Ward R, Camper SA** 2002 Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. *Development* 129:4229-4239
5. **Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, Camper SA** 2005 Role of PROP1 in Pituitary Gland Growth. *Molecular Endocrinology* 19:698-710
6. **Bilodeau S, Roussel-Gervais A, Drouin J** 2009 Distinct Developmental Roles of Cell Cycle Inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 Distinguish Pituitary Progenitor Cell Cycle Exit from Cell Cycle Reentry of Differentiated Cells. *Mol Cell Biol* 29:1895-1908
7. **Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama Ki** 1996 Mice Lacking p27Kip1 Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors. *Cell* 85:707-720
8. **Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson ICAF** 2008 SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:2907-2912
9. **Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JMW, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson ICAF, Dattani MT** 2006 Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest* 116:2442-2455

10. **Marieb EN** 1999 Anatomie et physiologie humaine. 4e Ed. (traduction) ed. Éditions du Renouveau pédagogique Inc.
11. **CHILDS GV, WESTLUND KN, UNABIA GEDA** 1989 Characterization of Anterior Pituitary Target Cells for Arginine Vasopressin: Including Cells that Store Adrenocorticotropin, Thyrotropin- $\alpha_1$ , and Both Hormones. *Endocrinology* 125:554-559
12. **Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Scott Y, III** 2009 Oxytocin: The great facilitator of life. *Progress in Neurobiology* 88:127-151
13. **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
14. **Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Tsai JP-Y, Couture C, Gauthier Y, Drouin J** 2003 Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes & Development* 17:738-747
15. **Wingstrand KG** 1966 Microscopic anatomy, nerve supply and blood supply of the pars intermedia. Berkeley and Los Angeles: University of California Press
16. **Cote TE, Felder R, Kebabian JW, Sekura RD, Reisine T, Affolter HU** 1986 D-2 dopamine receptor-mediated inhibition of pro-opiomelanocortin synthesis in rat intermediate lobe. Abolition by pertussis toxin or activators of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 261:4555-4561
17. **Gantz I, Fong TM** 2003 The melanocortin system. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 284:E468-E474
18. **Bonnefont X, Lacampagne A, Sanchez-Hormigo A, Fino E, Creff A, Mathieu MN, Smallwood S+, Carmignac D, Fontanaud P, Travo P, Alonso G+, Courtois-Coutry N, Pincus SM, Robinson ICAF, Mollard P** 2005 Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16880-16885
19. **Budry L, Lafont C, El Yandouzi T, Chauvet N, Con+@jero Gv, Drouin J, Mollard P** 2011 Related pituitary cell lineages develop into interdigitated 3D cell networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
20. **Bilezikjian LM, Blount AL, Vale WW** 1987 The Cellular Actions of Vasopressin on Corticotrophs of the Anterior Pituitary: Resistance to Glucocorticoid Action. *Molecular Endocrinology* 1:451-458
21. **ROSENBERG D, GROUSSIN L, JULLIAN E, PERLEMOINE K, BERTAGNA X, BERTHERAT J** 2002 Role of the PKA-Regulated Transcription

Factor CREB in Development and Tumorigenesis of Endocrine Tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* 968:65-74

22. **Lightman SL, Conway-Campbell BL** 2010 The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* 11:710-718
23. **Poulin G, Turgeon B, Drouin J** 1997 NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
24. **Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, 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
25. **Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, Malpuech G, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, Drouin J** 2003 Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes & Development* 17:711-716
26. **Vallette-Kasic S, Couture C, Balsalobre A, Gauthier Y, Metherell L, Dattani M, Drouin J** 2007 The TPIT Gene Mutation M86R Associated with Isolated Adrenocorticotropin Deficiency Interferes with Protein: Protein Interactions. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92:3991-3999
27. **Vallette-Kasic S, Brue T, Pulichino AM, Gueydan M, Barlier A, David M, Nicolino M, Malpuech G, D+@chelotte P, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, de Zegher F, Beckers D, Kylo J, Donohoue P, Fassnacht M, Hahner S, Allolio B, Noordam C, Dunkel L, Hero M, Pigeon B, Weill J, Yigit S, Brauner R, Heinrich JJ, Cummings E, Riddell C, Enjalbert A, Drouin J** 2005 Congenital Isolated Adrenocorticotropin Deficiency: An Underestimated Cause of Neonatal Death, Explained by TPIT Gene Mutations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90:1323-1331
28. *Physiologie médicale* 2004 21e Édition ed. Les Presses de l'Université Laval
29. **Nussey S, Whitehead S** 2001 *Endocrinology: An Integrated Approach*. BIOS Scientific Publishers Limited
30. **Wang M** 2005 The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2:3
31. **Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, Johnson TA, Voss TC, Lightman SL, Hager GL** 2009 Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol* 11:1093-1102



32. **Conway-Campbell BL, George CL, Pooley JR, Knight DM, Norman MR, Hager GL, Lightman SL** 2011 The HSP90 Molecular Chaperone Cycle Regulates Cyclical Transcriptional Dynamics of the Glucocorticoid Receptor and Its Coregulatory Molecules CBP/p300 During Ultradian Ligand Treatment. *Molecular Endocrinology* 25:944-954
33. **Baid SK, Nieman LK** 2006 Therapeutic doses of glucocorticoids: implications for oral medicine. *Oral Diseases* 12:436-442
34. **TURNBULL AV, RIVIER CL** 1999 Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action. *Physiological Reviews* 79:1-71
35. **MUNCK ALLA, GUYRE PM, HOLBROOK NJ** 1984 Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions. *Endocr Rev* 5:25-44
36. **Ruzek MC, Pearce BD, Miller AH, Biron CA** 1999 Endogenous Glucocorticoids Protect Against Cytokine-Mediated Lethality During Viral Infection. *The Journal of Immunology* 162:3527-3533
37. **KAPCALA LP, CHAUTARD THIE, ESKAY RL** 1995 The Protective Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis against Lethality Produced by Immune, Infectious, and Inflammatory Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771:419-437
38. **Melmed S** 2001 Series introduction. The immuno-neuroendocrine interface. *J Clin Invest* 108:1563-1566
39. **Wang Z, Ren SG, Melmed S** 1996 Hypothalamic and pituitary leukemia inhibitory factor gene expression in vivo: a novel endotoxin-inducible neuro-endocrine interface. *Endocrinology* 137:2947-2953
40. **Beishuizen A, Thijs LG** 2003 Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res* 9:3-24
41. **Gloddek J, Lohrer P, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Renner U** 2001 The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharide on ACTH secretion is mediated by paracrine-acting IL-6. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:410,415
42. **Van der Meer MJ, Sweep CG, Pesman GJ, Borm GF, Hermus AR** 1995 Synergism between IL-1 beta and TNF-alpha on the activity of the pituitary-adrenal axis and on food intake of rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 268:E551-E557

43. **Muglia LJ, Jacobson L, Weninger SC, Karalis KP, Jeong K, Majzoub JA** 2001 The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice. *Peptides* 22:725-731
44. **Venihaki M, Majzoub J** 2002 Lessons from CRH knockout mice. *Neuropeptides* 36:96-102
45. **Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y** 1998 Production of Mice Deficient in Genes for Interleukin (IL)-1a, IL-1b, IL-1a/b, and IL-1 Receptor Antagonist Shows that IL-1 $\alpha$  Is Crucial in Turpentine-induced Fever Development and Glucocorticoid Secretion. *The Journal of Experimental Medicine* 187:1463-1475
46. **Vallières L, Rivest S** 1999 Interleukin-6 Is a Needed Proinflammatory Cytokine in the Prolonged Neural Activity and Transcriptional Activation of Corticotropin-Releasing Factor during Endotoxemia. *Endocrinology* 140:3890-3903
47. **Chida D, Imaki T, Suda T, Iwakura Y** 2005 Involvement of Corticotropin-Releasing Hormone- and Interleukin (IL)-6-Dependent Proopiomelanocortin Induction in the Anterior Pituitary during Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation by IL-1 $\alpha$ . *Endocrinology* 146:5496-5502
48. **Wilder RL** 1995 Neuroendocrine-Immune System Interactions and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 13:307-338
49. **Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ** 2000 Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:9317-9322
50. **Yano H, Readhead C, Nakashima M, Ren SG, Melmed S** 1998 Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* 12:1708-1720
51. **Akita S, Malkin J, Melmed S** 1996 Disrupted murine leukemia inhibitory factor (LIF) gene attenuates adrenocorticotropin hormone (ACTH) secretion. *Endocrinology* 137:3140-3143
52. **Chesnokova V, Auernhammer CJ, Melmed S** 1998 Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* 139:2209-2216
53. **Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP** 1999 New Insights into the Biology of the Acute Phase Response. *Journal of Clinical Immunology* 19:203-214

54. **Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, Fong HE, Cheung CC, Mak TW** 2006 Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1834-1839
55. **Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A** 2004 Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432:917-921
56. **Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V** 2001 Essential Role of STAT3 in the Control of the Acute-Phase Response as Revealed by Inducible Gene Activation in the Liver. *Mol Cell Biol* 21:1621-1632
57. **Baumann H, Richards C, Gauldie J** 1987 Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. *The Journal of Immunology* 139:4122-4128
58. **Nishimoto N, Kishimoto T** 2008 Humanized Antihuman IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab. In: Chernajovsky Y, Nissim A, eds. *Therapeutic Antibodies*. 181 ed. Springer Berlin Heidelberg; 151-160
59. **Phuc Le P, Friedman JR, Schug J, Brestelli JE, Parker JB, Bochkis IM, Kaestner KH** 2005 Glucocorticoid Receptor-Dependent Gene Regulatory Networks. *PLoS Genet* 1:e16
60. **Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W, Schütz G** 2004 Inactivation of the Glucocorticoid Receptor in Hepatocytes Leads to Fasting Hypoglycemia and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Molecular Endocrinology* 18:1346-1353
61. **Vegiopoulos A, Herzig S** 2007 Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275:43-61
62. **Farrell GC, Larter CZ** 2006 Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43:S99-S112
63. **Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K** 2002 Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96:23-43
64. **Seckl JR** 2004 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Current Opinion in Pharmacology* 4:597-602
65. **Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU** 2000 How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev* 21:55-89

66. **Edwards CRW, Burt D, McIntyre MA, De Kloet ER, Stewart PM, Brett L, Sutanto WS, Monder C** 1988 LOCALISATION OF 11[beta]-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE--TISSUE SPECIFIC PROTECTOR OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR. *The Lancet* 332:986-989
67. **Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CRW, Seckl JR, Mullins JJ** 1997 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or  $\beta$ stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:14924-14929
68. **Morton NM, Holmes MC, Fivet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR** 2001 Improved Lipid and Lipoprotein Profile, Hepatic Insulin Sensitivity, and Glucose Tolerance in 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Null Mice. *J Biol Chem* 276:41293-41300
69. **ELENKOV IJ, CHROUSOS GP** 2002 Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966:290-303
70. **Elenkov IJ, Chrousos GP** 2006 Stress System  $\beta$  Organization, Physiology and Immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 13:257-267
71. **Kadonaga JT** 2004 Regulation of RNA Polymerase II Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors. *Cell* 116:247-257
72. **Odom DT, Dowell RD, Jacobsen ES, Gordon W, Danford TW, MacIsaac KD, Rolfe PA, Conboy CM, Gifford DK, Fraenkel E** 2007 Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nat Genet* 39:730-732
73. **Frankel N, Davis GK, Vargas D, Wang S, Payre F, Stern DL** 2010 Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* 466:490-493
74. **Lee TI, Young RA** 2000 Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34:77-137
75. **Hassa PO, Hottiger MO** 2002 The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF- $\kappa$ B in inflammatory disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:1534-1553
76. **Ulevitch RJ** 2004 Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 4:512-520

77. **Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Cheng WF, Chang MC, Su JL, Hsieh CY** 2001 The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 20:5799-5809
78. **Akira S** 1997 IL-6-regulated transcription factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29:1401-1418
79. **Kalvakolanu DV, Roy SK** 2005 CCAAT/Enhancer Binding Proteins and Interferon Signaling Pathways. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25:757-769
80. **Niehof M, Streetz K, Rakemann T, Bischoff SC, Manns MP, Horn F, Trautwein C** 2001 Interleukin-6-induced Tethering of STAT3 to the LAP/C/EBP $\beta$  Promoter Suggests a New Mechanism of Transcriptional Regulation by STAT3. *J Biol Chem* 276:9016-9027
81. **Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I** 2001 Transactivation of C-Reactive Protein by IL-6 Requires Synergistic Interaction of CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) and Rel p50. *The Journal of Immunology* 166:2378-2384
82. **Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr.** 1993 Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13:3964-3974
83. **Lee YH, Williams SC, Baer M, Sterneck E, Gonzalez FJ, Johnson PF** 1997 The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol Cell Biol* 17:2038-2047
84. **Takiguchi M** 1998 The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *International Journal of Experimental Pathology* 79:369-391
85. **Oelgeschlager M, Nuchprayoon I, Luscher B, Friedman AD** 1996 C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol* 16:4717-4725
86. **Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P** 1990 Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-1204
87. **Schule R, Rangarajan P, Klierer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM** 1990 Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62:1217-1226

88. **Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M** 1990 Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-1215
89. **Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE, Jr.** 1992 Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258:1808-1812
90. **Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R, Darnell JE, Jr.** 1992 The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7840-7843
91. **Schindler C, Fu XY, Improta T, Aebersold R, Darnell JE, Jr.** 1992 Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7836-7839
92. **Bromberg J, Darnell JE, Jr.** 2000 The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473
93. **Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN, Jenkins NA** 1995 Distribution of the Mammalian Stat Gene Family in Mouse Chromosomes. *Genomics* 29:225-228
94. **Liu X, Quinn AM, Yue E, Fu XY** 1999 STAT Genes Found in *C. elegans*. *Science* 285:167
95. **Yan R, Small S, Desplan C, Dearolf CR, Darnell JE** 1996 Identification of a Stat Gene That Functions in *Drosophila* Development. *Cell* 84:421-430
96. **Takeda K, Akira S** 2000 STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:199-207
97. **O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD** 2002 Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway. *Cell* 109:S121-S131
98. **Horvath CM** 2000 STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends in Biochemical Sciences* 25:496-502
99. **Herrmann A, Sommer U, Pranada AL, Giese B, Kuster A, Haan S, Becker W, Heinrich PC, Müller-Newen G** 2004 STAT3 is enriched in nuclear bodies. *Journal of Cell Science* 117:339-349
100. **Carbia-Nagashima A, Arzt E** 2004 Intracellular Proteins and Mechanisms Involved in the Control of gp130/JAK/STAT Cytokine Signaling. *IUBMB Life* 56:83-88

101. **Levy DE, Darnell JE, Jr.** 2002 Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662
102. **Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr.** 1996 DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15:5616-5626
103. **Dumoutier L, de Meester C, Tavernier J, Renauld JC** 2009 New Activation Modus of STAT3. *J Biol Chem* 284:26377-26384
104. **Decker T, Kovarik P** 2000 Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628-2637
105. **Wen Z, Darnell JE** 1997 Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Research* 25:2062-2067
106. **Schuringa JJ, Schepers H, Vellenga E, Kruijer W** 2001 Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Letters* 495:71-76
107. **Schuringa JJ, Dekker LV, Vellenga E, Kruijer W** 2001 Sequential Activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and Protein Kinase C $\alpha$  Is Required for Interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 Phosphorylation and Transactivation. *J Biol Chem* 276:27709-27715
108. **Ng YP, Cheung ZH, Ip NY** 2006 STAT3 as a Downstream Mediator of Trk Signaling and Functions. *J Biol Chem* 281:15636-15644
109. **Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RDG** 2006 Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 442:823-826
110. **Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Kuriyan J** 1998 Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA. *Cell* 93:827-839
111. **Becker S, Groner B, Muller CW** 1998 Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394:145-151
112. **Yuan ZL, Guan Yj, Chatterjee D, Chin YE** 2005 Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science* 307:269-273

113. **Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C, Groner B** 2004 The Coactivator of Transcription CREB-binding Protein Interacts Preferentially with the Glycosylated Form of Stat5. *J Biol Chem* 279:3563-3572
114. **Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP** 1996 STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* 271:13221-13227
115. **Desiderio S, Yoo JY** 2003 A genome-wide analysis of the acute-phase response and its regulation by Stat3beta. *Ann N Y Acad Sci* 987:280-284
116. **Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, Murray-Tait V, Chiarle R, Poli V** 2004 The STAT3 isoforms [alpha] and [beta] have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5:401-409
117. **Schindler C, Levy DE, Decker T** 2007 JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *J Biol Chem* 282:20059-20063
118. **Snyder M, Huang XY, Zhang JJ** 2008 Identification of Novel Direct Stat3 Target Genes for Control of Growth and Differentiation. *J Biol Chem* 283:3791-3798
119. **Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG** 1998 Transcription Factor-Specific Requirements for Coactivators and Their Acetyltransferase Functions. *Science* 279:703-707
120. **Giraud S, Bienvenu Fdr, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O** 2002 Functional Interaction of STAT3 Transcription Factor with the Coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* 277:8004-8011
121. **Zhao H, Nakajima R, Kunimoto H, Sasaki T, Kojima H, Nakajima K** 2004 Region 752-761 of STAT3 is critical for SRC-1 recruitment and Ser727 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325:541-548
122. **Zhu Mh, John S, Berg M, Leonard WJ** 1999 Functional Association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN [gamma]-Mediated Signaling. *Cell* 96:121-130
123. **Yoo JY, Wang W, Desiderio S, Nathans D** 2001 Synergistic Activity of STAT3 and c-Jun at a Specific Array of DNA Elements in the +|2-Macroglobulin Promoter. *J Biol Chem* 276:26421-26429
124. **Oh MK, Park HJ, Kim NH, Park SJ, Park IY, Kim IS** 2011 Hypoxia-inducible Factor-1+| Enhances Haptoglobin Gene Expression by Improving Binding of STAT3 to the Promoter. *J Biol Chem* 286:8857-8865



125. **Cantwell CA, Sterneck E, Johnson PF** 1998 Interleukin-6-Specific Activation of the C/EBPdelta Gene in Hepatocytes Is Mediated by Stat3 and Sp1. *Mol Cell Biol* 18:2108-2117
126. **Chen T, Wang LH, Farrar WL** 2000 Interleukin 6 Activates Androgen Receptor-mediated Gene Expression through a Signal Transducer and Activator of Transcription 3-dependent Pathway in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 60:2132-2135
127. **Lerner L, Henriksen MA, Zhang X, Darnell JE, Jr.** 2003 STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* 17:2564-2577
128. **Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T** 1999 Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284:479-482
129. **Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J** 2005 Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* 115:202-213
130. **Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM** 1997 STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 272:30607-30610
131. **Hirano T, Ishihara K, Hibi M** 2000 Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19:2548-2556
132. **Saura M, Zaragoza C, Bao C, Herranz B, Rodriguez-Puyol M, Lowenstein CJ** 2006 Stat3 Mediates Interleukin-6 Inhibition of Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression. *J Biol Chem* 281:30057-30062
133. **Strömstedt P-E, Poellinger L, Gustafsson J-Å, Carlstedt-Duke J** 1991 The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. *Mol Cell Biol* 11:3379-3383
134. **Smith AM, Qualls JE, O'Brien K, Balouzian L, Johnson PF, Schultz-Cherry S, Smale ST, Murray PJ** 2011 A Distal Enhancer in Il12b Is the Target of Transcriptional Repression by the STAT3 Pathway and Requires the Basic Leucine Zipper (B-ZIP) Protein NFIL3. *J Biol Chem* 286:23582-23590
135. **Shuai K, Liu B** 2003 Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3:900-911

136. **Sekine Y, Tsuji S, Ikeda O, Sato N, Aoki N, Aoyama K, Sugiyama K, Matsuda T** 2006 Regulation of STAT3-mediated signaling by LMW-DSP2. *Oncogene* 25:5801-5806
137. **Zhang X, Guo A, Yu J, Possemato A, Chen Y, Zheng W, Polakiewicz RD, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE, Wang ZJ** 2007 Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:4060-4064
138. **Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K** 1997 Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805
139. **Junicho A, Matsuda T, Yamamoto T, Kishi H, Korkmaz K, Saatcioglu F, Fuse H, Muraguchi A** 2000 Protein Inhibitor of Activated STAT3 Regulates Androgen Receptor Signaling in Prostate Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278:9-13
140. **Jang HD, Yoon K, Shin YJ, Kim J, Lee SY** 2004 PIAS3 Suppresses NF-kB-mediated Transcription by Interacting with the p65/RelA Subunit. *J Biol Chem* 279:24873-24880
141. **Tirard M, Jasbinsek J, Almeida OF, Michaelidis TM** 2004 The manifold actions of the protein inhibitor of activated STAT proteins on the transcriptional activity of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in neural cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 32:825-841
142. **Long J, Wang G, Matsuura I, He D, Liu F** 2004 Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Proc Natl Acad Sci USA* 101:99-104
143. **Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M** 2000 Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:6493-6498
144. **Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ** 2001 Signaling by Type I and II cytokine receptors: ten years after. *Current Opinion in Immunology* 13:363-373
145. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily 1999 *Cell* 97:161-163
146. **Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ** 2006 Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126:789-799

147. **Flammer JR, Rogatsky I** 2011 Minireview: Glucocorticoids in Autoimmunity: Unexpected Targets and Mechanisms. *Molecular Endocrinology* 25:1075-1086
148. **Pratt WB, Toft DO** 1997 Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360
149. **La BJ, Yamamoto KR** 1994 Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the glucocorticoid receptor zinc finger region. *J Mol Biol* 239:664-688
150. **Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR** 2009 DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science* 324:407-410
151. **So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR** 2007 Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 3:e94
152. **Rogatsky I, Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq CM, Darimont BD, Garabedian MJ, Yamamoto KR** 2003 Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:13845-13850
153. **Bilodeau S, Vallette-Kasic S, Gauthier Y, Figarella-Branger D, Brue T, Berthelet F, Lacroix A, Batista D, Stratakis S, Hanson J, Meij B, Drouin J** 2006 Role of Brg1 and HDAC2 in GR *trans*-repression of pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev* 20:2871-2886
154. **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
155. **Lu NZ, Cidlowski JA** 2006 Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16:301-307
156. **Davies L, Paraskevopoulou E, Sadeq M, Symeou C, Pantelidou C, Demonacos C, Krstic-Demonacos M** 2011 Regulation of Glucocorticoid Receptor Activity by a Stress Responsive Transcriptional Cofactor. *Molecular Endocrinology* 25:58-71
157. **Beck IM, De Bosscher K, Haegeman G** 2011 Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research. *Trends in Endocrinology & Metabolism* In Press, Corrected Proof:
158. **Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De LA, Nemer M, Schmidt TJ** 1993 Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12:145-156

159. **Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, Yamamoto KR** 1988 Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* 2:1144-1154
160. **Steger DJ, Grant GR, Schupp M, Tomaru T, Lefterova MI, Schug J, Manduchi E, Stoeckert CJ, Lazar MA** 2010 Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes & Development* 24:1035-1044
161. **Yu CY, Mayba O, Lee JV, Tran J, Harris C, Speed TP, Wang JC** 2010 Genome-Wide Analysis of Glucocorticoid Receptor Binding Regions in Adipocytes Reveal Gene Network Involved in Triglyceride Homeostasis. *PLoS ONE* 5:e15188
162. **Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M, Chambon P** 2011 Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145:224-241
163. **Schüle R, Rangarajan P, Klierer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM** 1990 Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62:1217-1226
164. **Akerblom IE, Slater EP, Beato M, Baxter JD, Mellon PL** 1988 Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science* 241:350-353
165. **Stauber C, Altschmied J, Akerblom I, Marron J, Mellon PL** 1991 Glucocorticoid receptor represses transcription of the human glycoprotein alpha-subunit gene in a DNA-binding independent manner. *J Cell Biochem* 15B:277
166. **Ray A, Prefontaine KE** 1994 Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:752-756
167. **McKay LI, Cidlowski JA** 1999 Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20:435-459
168. **Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC** 1994 A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13:4087-4095
169. **Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G** 1998 DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93:531-541

170. **Reichardt HM, Tuckermann JP, Gottlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schutz G** 2001 Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20:7168-7173
171. **De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G** 2001 Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators. *Mol Endocrinol* 15:219-227
172. **De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G** 2000 Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3919-3924
173. **Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG, Glass CK** 2005 Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122:707-721
174. **Kassel O, Schneider S, Heilbock C, Litfin M, Gottlicher M, Herrlich P** 2004 A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters. *Genes Dev* 18:2518-2528
175. **Diefenbacher M, Sekula S, Heilbock C, Maier JV, Litfin M, van Dam H, Castellazzi M, Herrlich P, Kassel O** 2008 Restriction to Fos family members of Trip6-dependent coactivation and glucocorticoid receptor-dependent trans-repression of activator protein-1. *Mol Endocrinol* 22:1767-1780
176. **Rogatsky I, Luecke HF, Leitman DC, Yamamoto KR** 2002 Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:16701-16706
177. **Ito K, Barnes PJ, Adcock IM** 2000 Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20:6891-6903
178. **Kagoshima M, Wilcke T, Ito K, Tsaprouni L, Barnes PJ, Punchard N, Adcock IM** 2001 Glucocorticoid-mediated transrepression is regulated by histone acetylation and DNA methylation. *European Journal of Pharmacology* 429:327-334
179. **Kutoh E, Stromstedt PE, Poellinger L** 1992 Functional interference between the ubiquitous and constitutive octamer transcription factor 1 (OTF-1) and the glucocorticoid receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo subdomain of OTF-1. *Mol Cell Biol* 12:4960-4969

180. **Gauthier JM, Bourachot B, Doucas V, Yaniv M, Moreau-Gachelin F** 1993 Functional interference between the Spi-1/PU.1 oncoprotein and steroid hormone or vitamin receptors. *EMBO J* 12:5089-5096
181. **Chang TJ, Scher BM, Waxman S, Scher W** 1993 Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Molecular Endocrinology* 7:528-542
182. **Nishio Y, Isshiki H, Kishimoto T, Akira S** 1993 A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol* 13:1854-1862
183. **Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B** 1996 Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383:726-728
184. **Stoecklin E, Wissler M, Moriggl R, Groner B** 1997 Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 17:6708-6716
185. **Engblom D, Kornfeld JW, Schwake L, Tronche F, Reimann A, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R, Schutz G** 2007 Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes & Development* 21:1157-1162
186. **Aittomäki S, Pesu M, Groner B, Jänne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O** 2000 Cooperation Among Stat1, Glucocorticoid Receptor, and PU.1 in Transcriptional Activation of the High-Affinity Fc $\gamma$  Receptor I in Monocytes. *The Journal of Immunology* 164:5689-5697
187. **Tronche F, Opherk C, Moriggl R, Kellendonk C, Reimann A, Schwake L, Reichardt HM, Stangl K, Gau D, Hoeflich A, Beug H, Schmid W, Schutz G** 2004 Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes & Development* 18:492-497
188. **Subramaniam N, Champion J, Rafter I, Okret S** 2003 Cross-talk between glucocorticoid and retinoic acid signals involving glucocorticoid receptor interaction with the homeodomain protein Pbx1. *Biochem J* 370:1087-1095
189. **Mullick J, Anandatheerthavarada HK, Amuthan G, Bhagwat SV, Biswas G, Camasamudram V, Bhat NK, Reddy SEP, Rao V, Avadhani NG** 2001 Physical Interaction and Functional Synergy between Glucocorticoid Receptor and Ets2 Proteins for Transcription Activation of the Rat Cytochrome P-450c27 Promoter. *J Biol Chem* 276:18007-18017

190. **Roux J, Pictet R, Grange T** 1995 Hepatocyte nuclear factor 3 determines the amplitude of the glucocorticoid response of the rat tyrosine aminotransferase gene. *DNA Cell Biol* 14:385-396
191. **Maroder M, Farina AR, Vacca A, Felli MP, Meco D, Screpanti I, Frati L, Gulino A** 1993 Cell-specific bifunctional role of Jun oncogene family members on glucocorticoid receptor-dependent transcription. *Molecular Endocrinology* 7:570-584
192. **Shemshedini L, Knauthe R, Sassone-Corsi P, Pornon A, Gronemeyer H** 1991 Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of fos and jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J* 10:3839-3849
193. **Wang Y, Zhang JJ, Dai W, Lei KY, Pike JW** 1997 Dexamethasone potently enhances phorbol ester-induced IL-1beta gene expression and nuclear factor NF-kappaB activation. *The Journal of Immunology* 159:534-537
194. **Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK** 1993 Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* 268:5353-5356
195. **Mukhopadhyay SS, Wyszomierski SL, Gronostajski RM, Rosen JM** 2001 Differential Interactions of Specific Nuclear Factor I Isoforms with the Glucocorticoid Receptor and STAT5 in the Cooperative Regulation of WAP Gene Transcription. *Mol Cell Biol* 21:6859-6869
196. **Cho IJ, Kim SG** 2009 A Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 and Glucocorticoid Receptor (GR) Interacting Protein-1-Dependent Combinatorial Mechanism of Gene Transrepression by GR. *Molecular Endocrinology* 23:86-99
197. **L+Âwenberg M, Tuynman J, Scheffer M, Verhaar A, Vermeulen L, van Deventer S, Hommes D, Peppelenbosch M** 2006 Kinome Analysis Reveals Nongenomic Glucocorticoid Receptor-Dependent Inhibition of Insulin Signaling. *Endocrinology* 147:3555-3562
198. **Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M** 1995 Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF-+|B Activity Through Induction of I+|B Synthesis. *Science* 270:286-290
199. **Ishmael FT, Fang X, Houser KR, Pearce K, Abdelmohsen K, Zhan M, Gorospe M, Stellato C** 2011 The Human Glucocorticoid Receptor as an RNA-Binding Protein: Global Analysis of Glucocorticoid Receptor-Associated Transcripts and Identification of a Target RNA Motif. *The Journal of Immunology* 186:1189-1198

200. **Necela BM, Cidlowski JA** 2004 A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. *J Biol Chem* 279:39279-39288
201. **Taniguchi Y, Iwasaki Y, Tsugita M, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y** 2010 Glucocorticoid receptor-beta and receptor-gamma exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. *Endocrinology* 151:3204-3213
202. **Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA** 2001 Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6865-6870
203. **Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA** 2006 The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1069:1-9
204. **Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP** 2009 Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 381:671-675
205. **Oakley RH, Cidlowski JA** 2011 Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *J Biol Chem* 286:3177-3184
206. **Lu NZ, Cidlowski JA** 2005 Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18:331-342
207. **Bockmuhl Y, Murgatroyd CA, Kuczynska A, Adcock IM, Almeida OFX, Spengler D** 2011 Differential Regulation and Function of 5'-Untranslated GR-Exon 1 Transcripts. *Molecular Endocrinology*
208. **Chen W, Dang T, Blind RD, Wang Z, Cavasotto CN, Hittelman AB, Rogatsky I, Logan SK, Garabedian MJ** 2008 Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Differentially Affects Target Gene Expression. *Molecular Endocrinology* 22:1754-1766
209. **Gallagher-Beckley AJ, Williams JG, Collins JB, Cidlowski JA** 2008 Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ -Mediated Serine Phosphorylation of the Human Glucocorticoid Receptor Redirects Gene Expression Profiles. *Mol Cell Biol* 28:7309-7322
210. **Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA** 1997 Mouse Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Status Influences Multiple Functions of the Receptor Protein. *J Biol Chem* 272:9287-9293



211. **Mao J, Regelson W, Kalimi M** 1992 Molecular mechanism of RU 486 action: a review. *Molecular and Cellular Biochemistry* 109:1-8
212. **Peeters BWMM, Ruigt GSF, Craighead M, Kitchener P** 2008 Differential Effects of the New Glucocorticoid Receptor Antagonist ORG 34517 and RU486 (Mifepristone) on Glucocorticoid Receptor Nuclear Translocation in the AtT20 Cell Line. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148:536-541
213. **Zhang S, Jonklaas J, Danielsen M** 2007 The glucocorticoid agonist activities of mifepristone (RU486) and progesterone are dependent on glucocorticoid receptor levels but not on EC50 values. *Steroids* 72:600-608
214. **Takeuchi S, Teshigawara K, Takahashi S** 1999 Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1450:452-459
215. **SEIDAH NG, BENJANNET SUZA, HAMELIN JOS+, MAMARBACHI AM, BASAK AJOY, MARCINKIEWICZ JADW, MBIKAY MAJA, CHR+ëTIEN MICH, MARCINKIEWICZ MIEC** 1999 The Subtilisin/Kexin Family of Precursor Convertases: Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the Novel Enzyme SKI-1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 885:57-74
216. **Funkelstein L, Toneff T, Mosier C, Hwang SR, Beuschlein F, Lichtenauer UD, Reinheckel T, Peters C, Hook V** 2008 Major Role of Cathepsin L for Producing the Peptide Hormones ACTH, b-Endorphin, and a-MSH, Illustrated by Protease Gene Knockout and Expression. *J Biol Chem* 283:35652-35659
217. **Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW** 1999 *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th Edition ed. Philadelphia: Lippincott-Raven
218. **Schaffer JV, Bologna JL** 2001 The Melanocortin-1 Receptor: Red Hair and Beyond. *Arch Dermatol* 137:1477-1485
219. **TSATMALI MARI, ANCANS JANI, YUKITAKE JUN, THODY AJ** 2000 Skin POMC Peptides: Their Actions at the Human MC-1 Receptor and Roles in the Tanning Response. *Pigment Cell Research* 13:125-129
220. **de Souza FSJ, Santangelo AM, Bumachny V, Avale ME, Smart JL, Low MJ, Rubinstein M** 2005 Identification of Neuronal Enhancers of the Proopiomelanocortin Gene by Transgenic Mouse Analysis and Phylogenetic Footprinting. *Mol Cell Biol* 25:3076-3086
221. **Young JI, Otero Vn, Cerd+in MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, Rubinstein M** 1998 Authentic Cell-Specific and Developmentally Regulated Expression of Pro-Opiomelanocortin Genomic Fragments in Hypothalamic and Hindbrain Neurons of Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience* 18:6631-6640

222. **BOHLER HCL, TRACER HOWA, MERRIAM GR, PETERSEN SL** 1991 Changes in Proopiomelanocortin Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Rostral Periaruate Region of the Female Rat during the Estrous Cycle. *Endocrinology* 128:1265-1269
223. **Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grutters A** 2003 Obesity Due to Proopiomelanocortin Deficiency: Three New Cases and Treatment Trials with Thyroid Hormone and ACTH4-10. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88:4633-4640
224. **MacNeil DJ, Howard AD, Guan X, Fong TM, Nargund RP, Bednarek MA, Goulet MT, Weinberg DH, Strack AM, Marsh DJ, Chen HY, Shen CP, Chen AS, Rosenblum CI, MacNeil T, Tota M, MacIntyre ED, Van der Ploeg LHT** 2002 "The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity". *European Journal of Pharmacology* 450:93-109
225. **Cone RD** 2000 Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor: part of a thrifty genotype? *J Clin Invest* 106:185-187
226. **Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grutters A** 1998 Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19:155-157
227. **Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U** 1999 Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5:1066-1070
228. **Drouin J, Nemer M, Charron J, Gagner JP, Jeannotte L, Sun YL, Therrien M, Tremblay Y** 1989 Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome* 31:510-519
229. **Therrien M, Drouin J** 1991 Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492-3503
230. **Therrien M, Drouin J** 1993 Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13:2342-2353
231. **Lavoie PL, Budry L, Balsalobre AI, Drouin J** 2008 Developmental Dependence on NurRE and EboxNeuro for Expression of Pituitary Proopiomelanocortin. *Molecular Endocrinology* 22:1647-1657
232. **Liu M, Pleasure SJ, Collins AE, Noebels JL, Naya FJ, Tsai MJ, Lowenstein DH** 2000 Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5679]. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:865-870

233. **Mutoh H, Naya FJ, Tsai MJ, Leiter AB** 1998 The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev* 12:820-830
234. **Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ** 1997 Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11:2323-2334
235. **Yan RT, Wang SZ** 2004 Requirement of NeuroD for Photoreceptor Formation in the Chick Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45:48-58
236. **Kispert A, Hermann BG** 1993 The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 12:4898-4899
237. **Matsumoto S, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Hirato J, Mori M** 2009 Liver X Receptor- $\alpha$  Regulates Proopiomelanocortin (POMC) Gene Transcription in the Pituitary. *Molecular Endocrinology* 23:47-60
238. **Hillhouse EW, Grammatopoulos DK** 2006 The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27:260-286
239. **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
240. **Reisine T, Rougon G, Barbet J, Affoter 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 USA* 82:8261-8265
241. **Lee AK, Tse A** 1997 Mechanism underlying corticotropin-releasing hormone (CRH) triggered cytosolic  $Ca^{2+}$  rise in identified rat corticotrophs. *The Journal of Physiology* 504:367-378
242. **Mangelsdorf DJ, Evans RM** 1995 The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850
243. **Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J** 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300
244. **Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, 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

245. **Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T** 2003 Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423:555-560
246. **Zhan Y, Du X, Chen H, Liu J, Zhao B, Huang D, Li G, Xu Q, Zhang M, Weimer BC, Chen D, Cheng Z, Zhang L, Li Q, Li S, Zheng Z, Song S, Huang Y, Ye Z, Su W, Lin SC, Shen Y, Wu Q** 2008 Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat Chem Biol* 4:548-556
247. **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
248. **Farmer SR, Wan KM, Ben-Ze'ev A, Penman S** 1983 Regulation of actin mRNA levels and translation responds to changes in cell configuration. *Mol Cell Biol* 3:182-189
249. **Maira MH, 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
250. **Maira MH, 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
251. **Maira MH, Couture C, Le Martelot G, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J** 2003 The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 coactivators and mediates hormone action. *J Biol Chem* 278:46523-46532
252. **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
253. **Rambaud J, Desroches J, Balsalobre A, Drouin J** 2009 TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *J Biol Chem* 284:14147-14156
254. **Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL, 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
255. **Boutillier AL, Gaiddon C, Lorang D, Roberts JL, Loeffler JP** 1998 Transcriptional activation of the proopiomelanocortin gene by cyclic AMP-responsive element binding protein. *Pituitary* 1:33-43

256. **Kovalovsky D, Paez Pereda M, Labeur M, Renner U, Holsboer F, Stalla GK, Arzt E** 2004 Nur77 induction and activation are necessary for interleukin-1 stimulation of proopiomelanocortin in AtT-20 corticotrophs. *FEBS Letters* 563:229-233
257. **Arzt E, Pereda MP, Castro CP, Pagotto U, Renner U, Stalla GK** 1999 Pathophysiological Role of the Cytokine Network in the Anterior Pituitary Gland. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20:71-95
258. **Ray DW, Ren SG, Melmed S** 1996 Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* 97:1852-1859
259. **Ihle JN** 1996 STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84:331-334
260. **Darnell JEJ** 1997 STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635
261. **Auernhammer CJ, Chesnokova V, Bousquet C, Melmed S** 1998 Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion. *Mol Endocrinol* 12:954-961
262. **Bousquet C, Susini C, Melmed S** 1999 Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor. *J Clin Invest* 104:1277-1285
263. **Bjork C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS** 1999 The Role of SOCS-3 in Leptin Signaling and Leptin Resistance. *J Biol Chem* 274:30059-30065
264. **Chesnokova V, Kariagina A, Melmed S** 2002 Opposing effects of pituitary leukemia inhibitory factor and SOCS-3 on the ACTH axis response to inflammation. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 282:E1110-E1118
265. **Mynard V, Guignat L, Devin-Leclerc J, BERTAGNA X, Catelli MG** 2002 Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology* 143:3916-3924
266. **Mynard V, Latchoumanin O, Guignat L, Devin-Leclerc J, BERTAGNA X, Barre B, Fagart J, Coqueret O, Catelli MG** 2004 Synergistic signaling by corticotropin-releasing hormone and leukemia inhibitory factor bridged by phosphorylated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein at the Nur response element (NurRE)-signal transducers and activators of transcription (STAT) element of the proopiomelanocortin promoter. *Mol Endocrinol* 18:2997-3010

267. **Bousquet C, Ray DW, Melmed S** 1997 A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J Biol Chem* 272:10551-10557
268. **Bousquet C, Melmed S** 1999 Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling. *J Biol Chem* 274:10723-10730
269. **Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S** 2000 Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106:1417-1425
270. **Abbud RA, Kelleher R, Melmed S** 2004 Cell-specific pituitary gene expression profiles after treatment with leukemia inhibitory factor reveal novel modulators for proopiomelanocortin expression. *Endocrinology* 145:867-880
271. **Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Eriksson P, Wrangé Ö** 1989 Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* 9:5305-5314
272. **Philips A, Maira MH, 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
273. **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
274. **Budry L, Couture C, Balsalobre A, Drouin J** 2011 The Ets factor Etv1 interacts with Tpit for pituitary Pro-opiomelanocortin (POMC) transcription. *J Biol Chem*
275. **Lamolet B, Poulin G, Chu K, Guillemot F, Tsai MJ, Drouin J** 2004 Tpit-Independent Function of NeuroD1(BETA2) in Pituitary Corticotroph Differentiation. *Molecular Endocrinology* 18:995-1003
276. **Petersen HV, Jensen JN, Stein R, Serup P** 2002 Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Letters* 528:241-245
277. **Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL** 1993 Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476

278. **Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J, Young RA** 2010 Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* doi:10.1038/:1-6
279. **Taatjes DJ** 2010 The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35:315-322
280. **Pani L, Quian XB, Clevidence D, Costa RH** 1992 The restricted promoter activity of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 beta involves a cell-specific factor and positive autoactivation. *Mol Cell Biol* 12:552-562
281. **Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, Berthelet F, Lacroix A, Figarella-Branger D, Brue T, Drouin J** 2010 Cooperation between cyclin E and p27Kip1 in pituitary tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 24:1835-1545
282. **Schmidt D, Wilson MD, Ballester B, Schwalie PC, Brown GD, Marshall A, Kutter C, Watt S, Martinez-Jimenez CP, Mackay S, Talianidis I, Flicek P, Odom DT** 2010 Five-Vertebrate ChIP-seq Reveals the Evolutionary Dynamics of Transcription Factor Binding. *Science* 328:1036-1040
283. **Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS, Taatjes DJ, Dekker J, Young RA** 2010 Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* doi:10.1038/:1-6
284. **Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N** 2002 Capturing Chromosome Conformation. *Science* 295:1306-1311
285. **Langlais D, Couture C, Sylvain-Drolet G, Balsalobre A, Drouin J** 2010 A novel enhancer of the POMC gene contributes preferential activity in pituitary corticotroph rather than melanotrope cells. Submitted
286. **Rougvie AE, Lis JT** 1988 The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54:795-804
287. **Muse GW, Gilchrist DA, Nechaev S, Shah R, Parker JS, Grissom SF, Zeitlinger J, Adelman K** 2007 RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* 39:1507-1511
288. **Zeitlinger J, Stark A, Kellis M, Hong JW, Nechaev S, Adelman K, Levine M, Young RA** 2007 RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* 39:1512-1516

289. **Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT** 2008 Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science* 322:1845-1848
290. **Nechaev S, Fargo DC, dos Santos G, Liu L, Gao Y, Adelman K** 2010 Global Analysis of Short RNAs Reveals Widespread Promoter-Proximal Stalling and Arrest of Pol II in *Drosophila*. *Science* 327:335-338
291. **Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA, Young RA** 2010 c-Myc Regulates Transcriptional Pause Release. *Cell* 141:432-445
292. **Latchoumanin O, Mynard V, Devin-Leclerc J, Dugue MA, BERTAGNA X, Catelli MG** 2007 Reversal of glucocorticoids-dependent proopiomelanocortin gene inhibition by leukemia inhibitory factor. *Endocrinology* 148:422-432
293. **Zeller KI, Zhao X, Lee CWH, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, Ooi HS, Orlov YL, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov VA, Sung WK, Ruan Y, Dang CV, Wei CL** 2006 Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:17834-17839
294. **Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G** 2008 Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452:45-50
295. **Denslow SA, Wade PA** 2007 The human Mi-2//NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26:5433-5438
296. **Glezer I, Chernomoretz A, David S, Plante MMI, Rivest S** 2007 Genes Involved in the Balance between Neuronal Survival and Death during Inflammation. *PLoS ONE* 2:e310
297. **Haller O, Staeheli P, Kochs G** 2007 Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89:812-818
298. **Mashimo T, Glaser P, Lucas M, Simon-Chazottes D, Ceccaldi PE, Montagutelli X, Despres P, Guenet JL** 2003 Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2',5'-oligoadenylate synthetases. *Genomics* 82:537-552
299. **Reich NC** 2002 Review: Nuclear/Cytoplasmic Localization of IRFs in Response to Viral Infection or Interferon Stimulation. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 22:103-109



300. **Honda K, Takaoka A, Taniguchi T** 2006 Type I Interferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. *Immunity* 25:349-360
301. **Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T** 2005 IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434:772-777
302. **Alam T, An MR, Papaconstantinou J** 1992 Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* 267:5021-5024
303. **Wipperfurth B, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Hacham R, RJG** 2007 Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBP $\beta$  by GCN5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:2703-2708
304. **Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF** 1997 An essential role for C/EBP $\beta$  in female  $\Gamma$  cell reproduction. *Genes & Development* 11:2153-2162
305. **Ramji DP, Foka P** 2002 CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575
306. **Xiao W, Wang L, Yang X, Chen T, Hodge D, Johnson PF, Farrar W** 2001 CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  Mediates Interferon- $\alpha$ -induced p48 (ISGF3- $\beta$ ) Gene Transcription in Human Monocytic Cells. *J Biol Chem* 276:23275-23281
307. **Litvak V, Ramsey SA, Rust AG, Zak DE, Kennedy KA, Lampano AE, Nykter M, Shmulevich I, Aderem A** 2009 Function of C/EBP $\delta$  in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat Immunol* 10:437-443
308. **Leenders JJ, Wijnen WJ, Hiller M, van der Made I, Lentink V, van Leeuwen REW, Herias V, Pokharel S, Heymans S, de Windt LJ, H $\beta$ cydal MA, Pinto YM, Creemers EE** 2010 Regulation of Cardiac Gene Expression by KLF15, a Repressor of Myocardin Activity. *J Biol Chem* 285:27449-27456
309. **Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H, Fujino T, Tanaka T, Asaba H, Iwasaki S, Ioka RX, Kaneko IW, Magoori K, Takahashi S, Mori T, Sakaue H, Kodama T, Yanagisawa M, Yamamoto TT, Ito S, Sakai J** 2004 A Kr $\beta$ -like factor KLF15 Contributes Fasting-induced Transcriptional Activation of Mitochondrial Acetyl-CoA Synthetase Gene AceCS2. *J Biol Chem* 279:16954-16962
310. **Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R, Kasuga M** 2005 Role of Kr $\beta$ -like Factor 15 (KLF15) in Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *J Biol Chem* 280:12867-12875

311. **Asada M, Rauch A, Shimizu H, Maruyama H, Miyaki S, Shibamori M, Kawasome H, Ishiyama H, Tuckermann J, Asahara H** 2011 DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Kruppel-like factor 15 gene expression. *Lab Invest* 91:203-215
312. **John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung MH, Biddie SC, Johnson TA, Hager GL, Stamatoyannopoulos JA** 2011 Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet* 43:264-268
313. **Biddie S, John S, Sabo P, Thurman R, Johnson T, Schiltz Rá, Miranda T, Sung MH, Trump S, Lightman S, Vinson C, Stamatoyannopoulos J, Hager G** 2011 Transcription Factor AP1 Potentiates Chromatin Accessibility and Glucocorticoid Receptor Binding. *Molecular Cell* 43:145-155
314. **Laganiere J, Deblois G, Lefebvre C, Bataille AR, Robert F, Giguere V** 2005 From the Cover: Location analysis of estrogen receptor {alpha} target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11651-11656
315. **Hurtado A, Holmes KA, Ross-Innes CS, Schmidt D, Carroll JS** 2011 FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat Genet* 43:27-33
316. **Siersbaek R, Nielsen R, John S, Sung MH, Baek S, Loft A, Hager GL, Mandrup S** 2011 Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J* 30:1459-1472
317. **Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK** 2010 Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Molecular Cell* 38:576-589
318. **McGough JM, Yang D, Huang S, Georgi D, Hewitt SM, R+Äcken C, T+ñnzer M, Ebert MPA, Liu K** 2008 DNA Methylation Represses IFN-+|ΓÇôInduced and Signal Transducer and Activator of Transcription 1ΓÇôMediated IFN Regulatory Factor 8 Activation in Colon Carcinoma Cells. *Molecular Cancer Research* 6:1841-1851

