



Université de Montréal

**LA DYNAMIQUE CHROMATINIENNE INDUITE  
PAR LE PIC DE LH DANS LES CELLULES DE  
GRANULOSA CHEZ LA SOURIS**

par

ANNE-MARIE BELLEFLEUR

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option reproduction

Septembre, 2012

© Anne-Marie Bellefleur, 2012

## Résumé

La régulation transcriptionnelle des gènes est un processus indispensable sans lequel la diversité phénotypique des cellules ainsi que l'adaptation à leur environnement serait inexistant. L'identification des éléments de régulation dans le génome est d'une importance capitale afin de comprendre les mécanismes gouvernant l'expression des gènes spécifiques à un type cellulaire donné. Ainsi, suite au pic de LH, le follicule ovarien entre dans un programme intensif de différenciation cellulaire, orchestré par des modifications majeures du profil transcriptionnel des cellules de granulosa, déclenchant ultimement l'ovulation et la lutéinisation, processus indispensables à la fertilité femelle. L'hypothèse supportée par cette étude stipule qu'une réorganisation de la structure chromatinienne survient aux régions régulatrices d'une panoplie de gènes dans les heures suivant le pic de LH et qu'en isolant et identifiant ces régions, il serait possible de retrouver des éléments essentiels aux processus d'ovulation et de lutéinisation. Ainsi, en utilisant un protocole standard de superovulation chez la souris, les éléments de régulation se modifiant 4h suivant l'administration de hCG ont été isolés et identifiés dans les cellules de granulosa en utilisant la méthode FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) combinée à un séquençage haut débit. Cette étude a démontré que suite au stimulus ovulatoire, les cellules de granulosa subissent une reprogrammation majeure des éléments de régulation, qui est corrélée avec une modification drastique de leurs fonctions biologiques. De plus, cette étude a mis en évidence une association majoritaire des éléments de régulation à des régions intergéniques distales et à des introns, indiquant que ces régions ont une importance capitale dans la régulation transcriptionnelle dans les cellules de granulosa. Cette étude a également permis d'identifier une panoplie de régulateurs transcriptionnels reconnus pour être essentiels à la fonction ovarienne, ainsi que leur sites de liaison dans le génome, démontrant que la méthode FAIRE est une méthode assez puissante pour permettre la prédiction d'événements moléculaires précis ayant un sens physiologique réel.

Mots clés : éléments de régulation, ovulation, lutéinisation, cellules de granulosa, formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE), régulateurs transcriptionnels

## **Abstract**

Identification of regulatory elements in the genome is of paramount importance to understanding the mechanisms governing the expression of specific genes in a given cell type. Following the LH surge, the ovarian peri-ovulatory follicle enters an intensive program of cellular differentiation, orchestrated by major changes in the transcriptional profile of granulosa cells, ultimately triggering ovulation and luteinization, processes essentials for fertility in females. In the mouse, several genes essential to the success of this program are induced 2 to 6 hours after the ovulatory stimulus. Using a standard protocol for superovulation in mice, the regulatory elements were isolated and identified in granulosa cells 4h after administration of hCG using the method FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) combined with next generation sequencing. The results of this analysis demonstrate that after the ovulatory stimulus, granulosa cells undergo a major reprogramming of regulatory elements, which is correlated with the extensive changes in their biological functions. In addition, this study showed that most regulatory elements were associated with distal intergenic regions and introns, indicating that these regions are important in transcriptional regulation in granulosa cells. A variety of transcriptional regulators known to be essential for ovarian function, and their binding sites were also identified in this analysis, demonstrating that the FAIRE method has the power to predict molecular events that have correlates in the known physiology of ovarian processes.

Key words: regulatory elements, ovulation, luteinization, granulosa cells, formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE), transcriptional regulators

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>ix</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>15</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>Revue de la littérature</b> .....	<b>19</b>
1. <i>Régulation de la transcription et structure chromatinienne</i> .....	19
1.1 De la double hélice au chromosome : la compaction de l'ADN .....	20
1.2 La transcription des gènes .....	22
1.3 Régulation transcriptionnelle et remodelage de la chromatine : La structure compacte de la chromatine, un obstacle à franchir .....	23
1.3.1 Le remodelage via les complexes ATP-dépendants .....	24
1.3.2 L'incorporation des variants d'histones .....	26
1.3.2.1 Les variants de l'histone H2A .....	26
1.3.2.2 Les variants de l'histone H3 .....	27
1.3.3 Les modifications post-traductionnelles des histones .....	27
1.3.3.1 L'acétylation des histones .....	28
1.3.3.2 La méthylation des histones .....	28
2. <i>Éléments de régulation et signature chromatinienne</i> .....	29
2.1 Signature chromatinienne et identification des éléments de régulation .....	29
3. <i>La biologie de l'ovaire</i> .....	31
3.1 La réponse des cellules somatiques aux gonadotrophines .....	32
3.2 La folliculogénèse .....	33
3.2.1 Recrutement initial des follicules primordiaux .....	35
3.2.2 La phase préantrale.....	35
3.2.3 La phase antrale.....	35
3.2.4 Formation des Follicules préovulatoires.....	36
3.2.5 Expansion du cumulus et ovulation.....	37
3.2.6 La lutéinisation : formation du corps jaune .....	38
4. <i>La régulation transcriptionnelle induite par le pic de LH dans les cellules de granulosa</i> .....	39
4.1 Les membres de la famille des CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs).....	39
4.2 Les membres de la famille des récepteurs nucléaires NR5A .....	40
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	<b>41</b>
1. <i>Animaux</i> .....	41
1.1 Superstimulation ovarienne.....	42
1.2 Récolte, purification et fixation des cellules de granulosa .....	42
2. <i>FAIRE</i> .....	43
2.1 Lyse des cellules de granulosa .....	43
2.2 sonication de la chromatine.....	43
2.3 Extraction phénol/chloroforme .....	43

2.4 Purification et dosage de l'ADN .....	44
3. Préparation des librairies pour séquençage <sup>120</sup> .....	44
3.1 End repair .....	44
3.2 Purification avec billes Agencourt AMPure (Beckman Coulter, A63881) .....	44
3.3 Sélection des fragments de 250 à 350 pb .....	45
3.4 Ligation des linkers .....	45
3.5 Nick translation .....	45
3.6 Amplification .....	46
4. Alignement au génome de référence et détection de signaux (peak calling) .....	46
5. Analyse bioinformatique .....	46
5.1 Distribution des signaux FAIRE .....	46
5.2 Association des signaux FAIRE à des régions spécialisées dans le génome .....	47
5.3 Analyse des processus biologiques représentés par les signaux FAIRE .....	47
5.4 Recherche de motifs de facteurs de transcription .....	47
5.5 Identification de site de liaison de facteurs de transcription .....	47
<b>Résultats .....</b>	<b>48</b>
1. Identification des éléments de régulation, à l'échelle du génome, dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire, par FAIRE-seq .....	48
2. Analyse ontologique des signaux FAIRE dans les cellules de granulosa du groupe PMSG et hCG. .	49
3. Groupes de gènes associés à des processus biologiques et profils FAIRE .....	51
3.1 Biosynthèse et transport du cholestérol .....	51
3.2 Stéroïdogénèse .....	52
3.3 Expansion du cumulus et ovulation .....	53
4. Analyse d'enrichissement de motifs .....	53
5. Analyse des sites de liaison des membres de la famille NR5A dans les cellules de granulosa .....	56
6. Prédiction des sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$ et C/EBP $\beta$ dans les cellules de granulosa chez la souris .....	58
<b>Discussion .....</b>	<b>60</b>
1. Les cellules de granulosa subissent une reprogrammation radicale suite au pic de LH .....	60
2. Distribution des signaux FAIRE dans les régions spécialisées de la chromatine .....	61
3. Analyse de motifs enrichis par FAIRE-seq .....	62
4. Prédiction de sites de liaison de facteurs de transcription : Analyse des site de liaison des membre de la famille NR5A .....	63
5. Identification de sites de liaison pour les facteurs C/EBP $\alpha$ et C/EBP $\beta$ .....	65
6. RUNX1 .....	66
<b>Conclusion .....</b>	<b>66</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>68</b>

## Liste des tableaux

### Résultats

<b>Table I</b> - Liste des motifs démontrant un enrichissement statistiquement significatif et étant reconnus pour avoir un rôle dans la fonction ovarienne.....	<b>55</b>
--	-----------

## Liste des figures

### Revue de la littérature

<b>Figure 1</b> - La compaction de l'ADN chez les cellules eukaryotes.....	<b>22</b>
<b>Figure 2</b> - Propriétés dynamiques des nucléosomes.....	<b>25</b>
<b>Figure 3</b> - Procédure FAIRE.....	<b>32</b>
<b>Figure 4</b> - Le concept deux cellules, deux gonadotrophines de la production de l'estradiol.....	<b>34</b>
<b>Figure 5</b> - Les stades de la folliculogenèse chez les mammifères.....	<b>35</b>

### Résultats

<b>Figure 6</b> - Distribution des signaux FAIRE dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire.....	<b>49</b>
<b>Figure 7</b> - Distribution des signaux FAIRE sur les régions génomiques spécialisées.....	<b>50</b>
<b>Figure 8</b> - Analyse ontologique des signaux FAIRE dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire.....	<b>51</b>
<b>Figure 9</b> - Profils FAIRE des gènes impliqués dans la biosynthèse (Hmgcr) et le transport du cholestérol (Apoa1, Apoa3, Apoa4, Abca1 et Npc1) dans les cellules de granulosa avant (PMSG, bleu) et après (hCG, rouge) le stimulus ovulatoire.....	<b>52</b>
<b>Figure 10</b> - Profils FAIRE de genes impliqués dans la stéroïdogénèse ( <i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp19a1</i> , <i>Star</i> , <i>Inha</i> et <i>Hsd3b1</i> ) dans les cellules de granulosa avant (bleu) et après (rouge) le stimulus ovulatoire.....	<b>53</b>
<b>Figure 11</b> - Profils FAIRE de gènes impliqués dans le processus ovulatoire ( <i>Pgr</i> , <i>Ereg</i> , <i>Btc</i> et <i>Tnfrsf6</i> ) dans les cellules de granulosa avant (PMSG, bleu) et après (hCG, rouge) le stimulus ovulatoire.....	<b>54</b>
<b>Figure 12</b> - Sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène <i>Star</i> dans les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.....	<b>58</b>



- Figure 13** - Sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Cyp19a1* dans les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.....**58**
- Figure 14)** Figure 14 - Sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Inha* dans les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.....**59**
- Figure 15** - Sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sur le gène *Has2* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire.....**59**
- Figure 16** - Sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sur le gène *Lepr* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire.....**60**
- Figure 17** - Sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sur le gène *Runx2* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire.....**60**

## Liste des sigles et abréviations

µl :	microlitre
µM :	micromètre
µM :	micromolaire
27G :	gauge 27
3β-HSD:	3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase
A:	adénosine
Abca1:	ATP-binding cassette transporter
AC/cAMP/PKA:	adenylate cyclase/ cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A
ADN:	acide déoxyribonucléique
ADP-ribosylation:	adenosine diphosphate-ribosylation
Apoa1:	apolipoprotein A1
Apoa3:	apolipoprotein A3
Apoa4:	apolipoprotein A4
Areg:	amphiregulin
ARN:	acide ribonucléique
ATP:	adenosine triphosphate
ATPases:	enzymes utilisant l'adénosine tri-phosphate comme source d'énergie
B6; 129:	Souche de souris issue du croisement des souches C57BL/6 et 129
Btc:	betacellulin
bzip :	basic-leucine zipper
C/EBPs:	CCAAT-enhancer-binding protein
C/EBPα:	CCAAT-enhancer-binding protein alpha
C/EBPβ:	CCAAT-enhancer-binding protein beta
C/EBPδ :	CCAAT-enhancer-binding protein delta
C:	cytosine
CCPA :	conseil canadien de protection des animaux

CEAS:	Cis-regulatory Element Annotation System
Cebpa/b-/- :	souris transgénique dont le gène Cebpa a été inactivé sur les deux allèles
Cebpbfl/fl;Cyp19/Cre:	modèle de souris transgéniques dont une partie fonctionnelle du gène Cebpb est flanké de sites LoxP et dont la recombinaison est sous le contrôle du promoteur du gène Cyp19
CÉUA :	Comité d'éthique sur l'utilisation des animaux
CHD:	chromodomain helicase
Chd1:	chromodomain helicase DNA binding protein 1
ChIP:	chromatin immunoprecipitation
ChIP-seq:	chromatin immunoprecipitation suivie d'un séquençage
cKO :	conditional knockout
CpG:	dinucléotide thymine-cytosine
CREB:	cAMP-response element-binding
Cyp11a1:	cytochrome P450 family 11 subfamily a polypeptide 1
CYP17a1:	cytochrome P450 family 17 subfamily a polypeptide 1
CYP19a1:	cytochrome P450 family 19 subfamily a polypeptide 1
DHEA:	déhydroépiandrostérone
DNaseI:	enzyme clivant l'acide déoxyribonucléique
DNMT:	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
ECM:	extracellular matrix
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF-like:	epidermal growth factor-like
EGFR:	epidermal growth factor receptor
EGTA:	ethylene glycol tetraacetic acid
EMSA:	electrophoretic mobility shift assay
Ereg:	epiregulin
ERK1/2:	extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2
FAIRE:	formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements
FAIRE-seq:	formaldehyde-assisted isolation of regulatory element suivi d'un séquençage
FDR:	false discovery rate
FOXO:	forkhead box O-class

FSH:	follicle stimulating hormone
FSHR:	follicle stimulating hormone receptor
FSH $\beta$ :	follicle stimulating hormone subunit $\beta$
G:	guanine
GATA:	facteurs reconnaissant la suite de nucléotides GATA sur l'ADN
GnRH:	gonadotrophin releasing hormone
GREAT:	genomic regions enrichment of annotations tool
GRMO2:	lignée de cellules de granulosa de souris 2
GTFs:	general transcription factors
H1:	histone 1
H2A.X:	variant x de l'histone 2a
H2A.Z:	variant z de l'histone 2a
H2A:	histone 2a
H2B:	histone 2b
H3.3:	variant 3 de l'histone 3
H3:	histone 3
H3K27:	histone 3, lysine 27
H3K36:	histone 3, lysine 36
H3K4:	histone 3, lysine 4
H3K9:	histone 3, lysine 9
H4:	histone 4
H4K20:	histone 4, lysine 20
Has2:	hyaluronic acid synthase 2
HATs:	histone acétyltransférases
hCG:	human chorionic gonadotropin
HDACs:	histone déacétylases
Hepes:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HF:	high fidelity
Hmgcr:	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
HP1:	heterochromatin protein 1
Hpdi:	human protein DNA Interactome
Hsd3b1:	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta isomerase 1

Igfbp3:	insulin-like growth factor-binding protein 3
Inha:	inhibin A
INO80:	inositol requiring 80
Irs2:	insulin receptor substrate 2
ISWI:	imitation iwitch
KGN:	lignée cellulaire originaire d'un carcinoma de cellules de granulosa de stade III humain
Lepr:	leptin receptor
LH:	luteinizing hormone
LH-R:	luteinizing hormone receptor
MA-10:	lignée de cellules tumorales de Leydig de souris
MACS:	Model-based Analysis of ChIP-Seq data
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MDScan:	Motif Discovery scan
mg:	milligramme
MISP:	Motif-based Interval Screener with PSSM
ml:	millilitre
mM :	millimolaire
mm9 :	mus musculus 9
MMP-2:	matrix metalloproteinase-2
MMP-9:	matrix metalloproteinase-9
MMPs:	matrix metalloproteinases
NaCl :	chlorure de sodium
ng :	nanogramme
Nos3:	nitric oxide synthase 3
Npc-1:	niemann-pick disease, type C1
NR5A:	nuclear receptor subfamily 5 group A
NR5A1:	nuclear receptor subfamily 5 group A member 1
NR5A2:	nuclear receptor subfamily 5 group A member 2
pb:	paire de bases
PBM:	Matha's Protein Binding Microarray
PBS:	phosphate buffered saline.
PCR:	polymerase chain reaction

Pgr:	progesteron receptor
PMSF:	phenylmethanesulfonyl fluoride
PMSG:	pregnant mare serum gonadotropin
Ptgs2:	prostaglandin synthase 2
qPCR:	quantitative polymerase chain reaction
RNAPII:	ribonucleic acid polymerase type II
RUNX1:	runt-related transcription factor 1
Runx2:	runt-related transcription factor 2
S139:	serine 139
SAM:	s-adenosyl methionine
SDS :	sodium dodecyl sulfate
sec:	secondes
SF-1:	steroidogenic factor-1
Sf-1fl/fl;Amhr-2/Cre :	modèle de souris transgéniques dont une partie fonctionnelle du gène Sf-1 est flanké de sites LoxP et dont la recombinase est sous le contrôle du promoteur du gène Amhr-2
SNF2:	sucrose nonfermentable 2
Star:	steroidogenic acute regulatory protein
SWI/SNF:	switch/sucrose nonfermentable
T:	thymine
T4 DNA ligase:	DNA ligase du bactériophage T4
TATA:	séquence d'ADN contenant les nucléotides TATA
TBP:	TATA-binding protein
TGFβ:	transforming growth factor beta
TIMPs:	tissue inhibitors of metalloproteinases
Tnfaip6:	tumor necrosis factor alpha-induced protein 6
TRANSFAC:	transcription factor database
TSS:	transcription start site
UI :	unités internationales
Valeur P :	valeur de probabilité
Y-1:	lignée cellulaire de tumeur du cortex surrénal murin
y1h:	yeast one-hybrid

*Je dédie ce travail à ma fille, Rosalie  
Bergeron. Je souhaite un jour pouvoir lui  
transmettre ma passion pour la science, avec  
tout le bonheur et l'émerveillement qu'elle  
déploie aujourd'hui à me faire redécouvrir le  
monde.*

## Remerciements

D'abord et avant tout, je tiens à remercier mes directeurs de recherche, le Dr. Bruce Murphy et le Dr. Nicolas Gévry. C'est par un accueil chaleureux que j'ai été accueilli et que j'ai traversé trois années dans le laboratoire du Dr. Bruce Murphy. Je tiens à le remercier pour sa confiance et son appui à travers l'évolution de mon projet de recherche et pour sa motivation et son enthousiasme devant l'accomplissement de celui-ci. Je vais toujours me souvenir de ses visites sociales, de ses suggestions de prénoms pour mon bébé et de mon mariage scientifique! Durant ces années, j'ai aussi eu le plaisir de travailler avec le Dr. Nicolas Gévry, en qui j'ai trouvé une grande source de motivation et de soutien. Grâce à lui, j'ai découvert une grande passion pour la recherche scientifique. Le Dr. Bruce Murphy et le Dr. Nicolas Gévry sont des chercheurs qui auront toujours ma plus grande admiration.

À travers les années passées dans le laboratoire du Dr. Murphy, j'ai eu l'occasion de partager mon quotidien avec des gens exceptionnels que je ne pourrai jamais oublier. Mira Dobias-Goff, une femme pleine d'énergie et d'amour, qui a toujours été là pour m'écouter et me reconforter dans les épreuves de ma vie, tant sur le plan personnel que professionnel. Merci d'avoir toujours cru en mes compétences! J'ai également eu le privilège de travailler avec Vickie Roussel, une professionnelle extraordinaire avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir et qui aura toujours une grande place dans mon cœur. Merci pour ton support technique, ton écoute et ta présence. La réalité des études graduées n'aurait pas été la même sans ma grande complice et amie Kalyne Bertolin. Merci pour toutes les souris, les génotypages et les conversations scientifiques. Merci pour toutes les pauses café et les lunchs improvisés! Merci pour tout...

Je prends également le temps de remercier les membres du laboratoire Gévry, qui ont toujours été très accueillants lors de mes nombreuses visites à l'Université de Sherbrooke. Je tiens à remercier du fond du cœur le Dr. Amy Sotelis, qui a été mon modèle de rigueur scientifique et à qui je dois l'apprentissage de toutes les techniques de base en biologie moléculaire. Je remercie également le Dr. Stéphanie Bianco, pour son



support technique indispensable pour la construction des librairies d'ADN et pour sa participation et ses nombreux conseils pour l'analyse bioinformatique. J'ajoute aussi un remerciement spécial à Mylène Brunelle, qui a toujours pris le temps de m'écouter et de m'encourager à travers mes questionnements existentiels d'étudiante aux études graduées! Merci à vous tous.

Je tiens également à souligner à quel point j'ai apprécié la nouvelle dynamique qui a accompagnée la venue des nouveaux étudiants dans le laboratoire du Dr. Murphy : Dr. Arnab Bernajee, Sandra Ruiz et Dr. Jane Fenelon, qui se sont greffés harmonieusement à notre petite famille scientifique.

Je tiens aussi à remercier ma fille, Rosalie Bergeron, d'avoir complètement déstabilisé mon monde et d'avoir fait de moi une meilleure personne! Sa présence dans ma vie m'a poussé à changer toutes mes priorités et m'a appris à ne donner de l'importance qu'aux choses importantes! J'espère qu'elle sera un jour fière de sa mère comme je suis fière d'elle aujourd'hui.

Je réserve mon remerciement le plus profond à mon mari, David Bergeron, grâce à qui j'ai tenue la route durant toutes ces années. Il a été là pour festoyer mes victoires, mais aussi pour essayer mes défaites. C'est grâce à lui et pour lui que j'ai su relever mes manches aux travers des défis qui se sont présentés durant ces années. Merci pour ta patience et ton soutien fidèle.

## Introduction

La folliculogénèse ovarienne est un processus complexe et finement régulé, durant lequel un follicule primordial se développe en follicule préovulatoire, qui ovule en réponse au pic sécrétoire de LH (luteinizing hormone). Après l'ovulation, les cellules somatiques composant le follicule, soit les cellules de granulosa et de la thèque, subissent un processus de différenciation cellulaire radical et se transforment en cellules lutéales pour former le corps jaune, glande endocrine essentielle au maintien de la gestation<sup>101</sup>. Ce programme est régulé par des gonadotrophines en provenance de l'hypophyse, la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH, de même que par des hormones stéroïdiennes et des facteurs de croissance locaux.

Des erreurs dans la régulation de ce programme de différenciation cellulaire peuvent avoir des conséquences dévastatrices sur les aptitudes de reproduction des individus affectés. Selon statistiques Canada, environ 8,5 % des couples canadiens en âge de procréer ont un problème d'infertilité et cette statistique concorde avec les taux d'infertilité partout dans le monde. À l'opposé, l'augmentation exponentielle de la population mondiale menace la planète et ses ressources. Ainsi, une meilleure compréhension des événements cellulaires et moléculaires qui contrôlent la croissance folliculaire, l'ovulation et la lutéinisation est d'une importance capitale afin de développer de meilleures stratégies de fécondation *in vitro*, de même que de nouvelles approches de contraception.

Chez la souris, il est possible d'induire artificiellement un cycle ovarien en administrant des molécules à activité FSH, soit le PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) et à activité LH, soit le hCG (human chorionic gonadotropin), ce qui en fait un modèle inestimable pour contrôler et étudier les processus clés de la fonction ovarienne, tels que la croissance folliculaire, l'ovulation et la lutéinisation<sup>29</sup>. Grâce à ce protocole de superovulation, il a été établi que le pic de LH active plusieurs cascades de signalisation intracellulaires dans les cellules de granulosa des follicules préovulatoires chez la souris<sup>116</sup>. Ces signaux induisent un changement rapide dans l'expression des gènes, qui cause ultimement l'ovulation et la lutéinisation. Un grand nombre de gènes

indispensables pour ces processus sont ainsi induit rapidement dans les heures suivant le stimulus ovulatoire, avec un niveau maximal d'expression situé entre 2 et 6 heures suivant l'administration de hCG<sup>21</sup>. Ce moment critique représente une fenêtre clé afin de retracer des éléments essentiels à la fonction ovarienne chez la souris. En utilisant des souris transgéniques, plusieurs régulateurs transcriptionnels ont été identifiés comme étant indispensables pour les processus d'ovulation et de lutéinisation, tels que les récepteurs nucléaires NR5A1<sup>106</sup> et NR5A2<sup>37</sup> ainsi que les facteurs de transcription C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ <sup>42</sup>.

Les régulateurs transcriptionnels sont reconnus pour se lier à des séquences qui leurs sont spécifiques sur l'ADN, appelés motifs, dans le but de réguler l'expression de gènes effecteurs précis. Cette régulation transcriptionnelle des gènes est essentielle pour permettre la diversité phénotypique des cellules, de même que pour permettre à chaque type cellulaire de s'adapter à son environnement, en répondant à des stimuli variés. Les motifs reconnus par ces régulateurs transcriptionnels se retrouvent sur des régions spécialisées dans le génome, appelés éléments de régulation. Ces éléments sont dissimulés dans une structure dense appelée chromatine, qui représente la forme sous laquelle se retrouve l'ADN dans le noyau. Le nucléosome, unité de base de la chromatine, est un complexe d'ADN et de protéines qui correspond au premier niveau de compaction de l'ADN et qui restreint son accessibilité aux régulateurs transcriptionnels.

Les éléments de régulation peuvent être isolés dans le génome, car ils présentent une signature chromatiniennne bien distincte, dont une caractéristique fondamentale est la déplétion des nucléosomes<sup>55</sup>. Cette distinction permet l'isolation et l'identification des éléments de régulation présents dans le génome d'un type cellulaire d'intérêt et dans une condition physiologique précise. Lieb *et al*, ont récemment développé une procédure simple afin d'isoler les régions du génomes déplétées en nucléosomes appelée formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE)<sup>54; 55</sup>.

L'hypothèse à l'origine de la présente étude stipule qu'une réorganisation de la structure chromatiniennne survient aux régions régulatrices d'une panoplie de gènes suite au pic de LH, induisant une reprogrammation transcriptionnelle majeure menant ultimement à la

différenciation des cellules de granulosa. En isolant ces régions dans le génome, il serait ainsi possible de retrouver des éléments essentiels aux processus d'ovulation et de lutéinisation. L'approche FAIRE-seq a ainsi été utilisée afin d'isoler et d'identifier de telles régions dans les cellules de granulosa de souris, avant et après le stimulus ovulatoire, dans le but de retrouver des informations clés sur ces processus.

Cette étude a permis de démontrer que suite au stimulus ovulatoire, les cellules de granulosa subissent une reprogrammation majeure des éléments de régulation, qui est corrélée avec une modification drastique de leurs fonctions biologiques. De plus, cette étude a mis en évidence une association majoritaire des éléments de régulation à des régions intergéniques distales et à des introns, indiquant que ce sont ces régions chromatiniques, plutôt que les promoteurs, qui ont une importance capitale dans la régulation transcriptionnelle des gènes dans les cellules de granulosa. Cette étude a également permis d'identifier une panoplie de régulateurs transcriptionnels déjà reconnus pour être essentiels à la fonction ovarienne, ainsi que leur sites de liaison dans le génome des cellules de granulosa chez la souris, démontrant que la méthode FAIRE est une méthode assez précise pour permettre la prédiction d'événements moléculaires précis, qui ont un sens physiologique réel.

## **Revue de la littérature**

### **1. Régulation de la transcription et structure chromatinienne**

Cette section présente les mécanismes de compaction de l'ADN sous forme de chromatine, ainsi que les mécanismes mis en œuvre par les cellules eukaryotes afin de favoriser l'accessibilité de l'ADN à des sites spéciaux, nommés éléments de régulation, qui sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Cette section décrira aussi une approche permettant d'isoler ces éléments dans le génome, une technique qui sera utilisée dans la présente étude afin de retrouver des éléments clés, essentiels aux processus de l'ovulation et de la lutéinisation chez la souris. Ainsi, cette section présentera également une vue d'ensemble des processus physiologiques et moléculaires propres aux différentes étapes de la folliculogenèse ovarienne.

## 1.1 De la double hélice au chromosome : la compaction de l'ADN

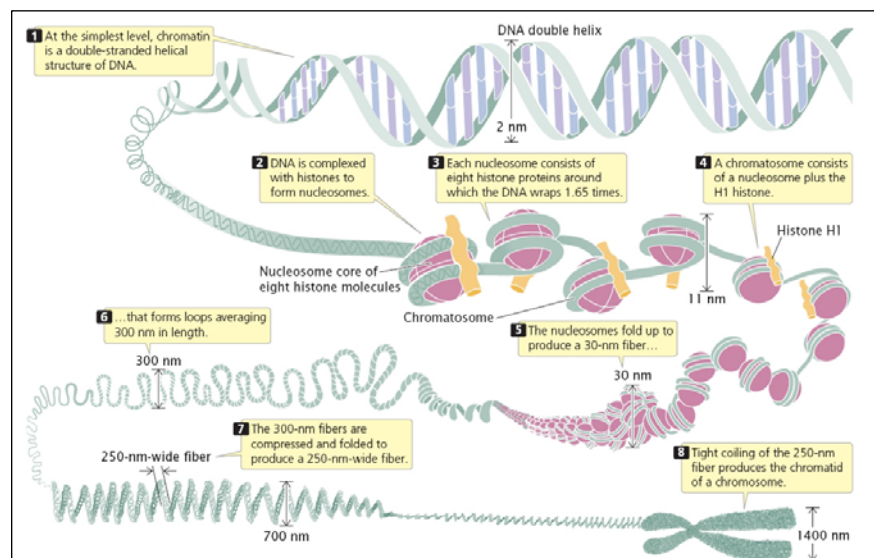
L'acide déoxyribonuléique, ou ADN, est la molécule qui contient l'information génétique. L'ADN encode les gènes, unité fonctionnelle de l'hérédité, et constitue ainsi un code à partir duquel tout organisme vivant se développe et fonctionne<sup>4</sup>. La molécule d'ADN consiste en deux longs polynucléotides composés de quatre différents types de nucléotides. Chacun de ces polynucléotides est appelé brin d'ADN et ces deux brins sont maintenus ensemble à l'aide de ponts hydrogènes. Les nucléotides formant les brins d'ADN sont composés d'un sucre, le déoxyribose, attaché à un groupe phosphate et d'une base, soit l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) ou la guanine (G). Les nucléotides sont liés entre eux de façon covalente par l'intermédiaire des sucres et groupements phosphates. Cette succession de nucléotides forme le « squelette » d'ADN, alternant sucre-phosphate-sucres-phosphates. Les propriétés chimiques et structurales de cet arrangement aboutissent à une structure tri-dimensionnelle en forme de double hélice, caractérisée par une orientation interne des bases A, T, C et G, s'appariant spécifiquement en paires de bases A-T et C-G. Cet appariement spécifique permet de maintenir une distance similaire entre les deux brins tout le long de la molécule d'ADN. Afin de maximiser l'efficacité de l'appariement, les deux squelettes s'enroulent l'un autour de l'autre pour former une double hélice, avec un tour complet toutes les 10 paires de bases<sup>137</sup>.

Chez les cellules eucaryotes, mis à part l'ADN mitochondrial, l'ADN se retrouve dans le noyau. Les cellules somatiques eucaryotes contiennent approximativement 6 milliards de paires de bases d'ADN nucléaire, empaquetées dans 23 paires de chromosomes. Puisque chaque paire de bases fait environ 0,34 nanomètre de longueur, chaque cellule contient environ 2 mètres d'ADN. Tout ce matériel doit être contenu dans le noyau, organelle microscopique dont le diamètre est d'environ 10-20 microns<sup>7</sup>.

Il est ainsi nécessaire de compacter l'ADN afin de permettre sa localisation nucléaire, un défi qui demande un niveau extraordinaire d'empaquetage. Pour que l'ADN soit fonctionnel lorsque nécessaire, cette tâche doit être accomplie avec la plus grande

organisation. En conséquence, l'ADN s'associe à des protéines qui sont en charge d'organiser précisément le contenu nucléaire en une structure compacte et dense, appelée fibre de chromatine. L'ADN génomique est ainsi compacté de manière hiérarchique par les histones<sup>134</sup>.

L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, qui comprend 145-147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, composé de deux copies des quatre histones canoniques H3, H4, H2A et H2B<sup>86</sup>. La structure en « collier de perles » formée par la succession des nucléosomes a un diamètre de 11 nm et représente le premier niveau d'organisation de la chromatine. L'ajout d'un histone de liaison, H1 ou H5, organise le tout en une structure encore plus compacte. Cette structure a un diamètre de 30 nm, comprend 6 nucléosomes par tour et représente le second niveau d'organisation de la chromatine, appelée fibre de 30nm (Figure 1)<sup>118</sup>.



**Figure 1: La compaction de l'ADN chez les cellules eukaryotes.**

La chromatine a une structure complexe avec plusieurs niveaux d'organisation. Le niveau le plus simple correspond à la double hélice d'ADN. Le premier niveau de compaction correspond au nucléosome. Image tirée de Pierce, Benjamin, 2005<sup>109</sup>.

L'organisation de la fibre de chromatine à des niveaux supérieurs, conduisant à la formation des chromosomes, est encore obscure et controversée. Par contre, il est devenu évident que la plasticité et la dynamique de la compaction de la chromatine soient des processus clés de la régulation de la transcription des gènes<sup>76</sup>.

## 1.2 La transcription des gènes

Tel que résumé par Ma, 2011, la transcription est le processus permettant de transcrire l'information présente sur un brin d'ADN en ARN (acide ribonucléique) par une enzyme appelée polymérase d'ARN<sup>88</sup>. Chez les eukaryotes, il existe trois différents types de polymérases d'ARN, chacune étant spécialisée dans la transcription de différentes classes de gènes<sup>60</sup>. La polymérase d'ARN de type II, ou RNAPII, est l'enzyme responsable de la transcription des gènes codant pour des protéines. En plus d'une séquence codante, ces gènes contiennent deux autres types de séquences d'ADN requises pour initier leur transcription.

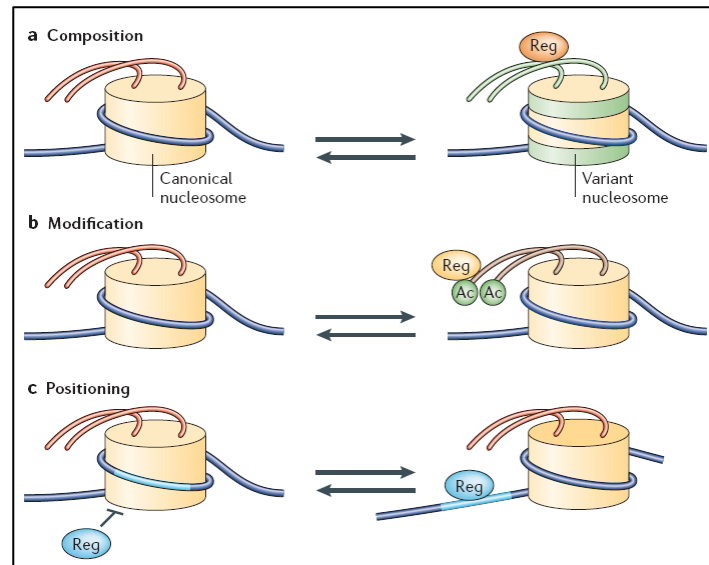
Premièrement, la région promotrice, aussi appelée promoteur, représente une séquence d'ADN située en amont de la séquence codante des gènes et oriente l'RNAPII sur l'ADN au bon endroit et dans le bon sens. Cette région contient des motifs qui spécifient le site du départ de la transcription (transcription start site, TSS) ainsi que des sites de liaison d'activateurs de la transcription qui résident à environ 150 paires de bases au pourtour du TSS. L'RNAPII n'a pas, à elle seule, l'habileté de reconnaître des séquences spécifiques sur l'ADN telles que les promoteurs. Ce sont des facteurs de transcription appelés généraux, GTFs, qui guident la polymérase aux séquences promotrices<sup>103</sup>. Un exemple classique de ces facteurs est la TATA-box binding protein (TBP), qui lie directement la séquence TATA du promoteur. Le complexe protéique ainsi assemblé à la région promotrice est appelé complexe de préinitiation ou machinerie transcriptionnelle. En plus des GTFs et de l'RNAPII, ce complexe comprend des co-facteurs ainsi que des facteurs de remodelage de la chromatine et cet ensemble forme l'holoenzyme RNAPII. Ces facteurs additionnels jouent un rôle important en régulant la transcription via leur interaction avec des protéines régulatrices<sup>138</sup>.

Le deuxième type de séquences d'ADN nécessaires afin d'initier la transcription sont des éléments de régulation spécialisés dans la liaison de protéines régulatrices. Chez les eukaryotes, ces éléments de régulation sont appelés « enhancers » et influencent la transcription des gènes indépendamment de leur orientation et de leur distance par rapport au TSS<sup>13</sup>. Les enhancers se situent en amont des gènes, mais ont également été retrouvés dans les introns, de même qu'en aval des gènes. Ces séquences sont le siège de la liaison d'une panoplie de facteurs de régulation qui influencent le status transcriptionnel des gènes dans le but de réguler finement le patron d'expression des gènes temporellement et de façon tissu-spécifique.

### **1.3 Régulation transcriptionnelle et remodelage de la chromatine : La structure compacte de la chromatine, un obstacle à franchir**

La régulation transcriptionnelle des gènes est un processus indispensable sans lequel la diversité phénotypique des cellules ainsi que l'adaptation à leur environnement serait inexistant<sup>97</sup>. Chez les eukaryotes, la nature compacte de l'ADN restreint son accès à la machinerie transcriptionnelle et la modulation de cette compaction crée un mécanisme de régulation de la transcription<sup>20</sup>. La chromatine est donc une structure dynamique sujette à des modifications ayant une influence sur son accessibilité<sup>9</sup>. Les nucléosomes étant stables et peu mobiles, leurs propriétés dynamiques proviennent de l'action de complexes multiprotéiques remodelant et modifiant ceux-ci. Parmi les facteurs qui altèrent la structure de la chromatine on compte: le remodelage via les complexes qui utilisent l'énergie de l'adénosine triphosphate (ATP-dépendants), l'incorporation de variants d'histones et les modifications post-traductionnelles des histones<sup>121</sup>. Ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs, mais collaborent plutôt ensemble afin de restructurer la chromatine (Figure 2).





**Figure 2 : Propriétés dynamiques des nucléosomes.**

**a)** Certains complexes de remodelage de l'ADN peuvent retirer les histones canoniques et les remplacer par des variants d'histones (indiqué en vert), pouvant être reconnus et liés par différentes protéines régulatrices (reg). **b)** Les modifications covalentes des histones (seulement l'acétylation -Ac- est illustrée à des fins de simplicité) permettent la liaison de facteurs de régulation ayant des domaines spécialisés qui reconnaissent les queues d'histones modifiées. **c)** Le repositionnement des nucléosomes permet la liaison de régulateurs transcriptionnels aux régions régulatrices sur l'ADN (segment bleu pâle). Les complexes de remodelage sont nécessaires afin de promouvoir un accès rapide à l'ADN en glissant ou en éjectant l'octamère d'histones sur l'ADN. Image tirée de Phillips, T. & Shaw, K, 2008<sup>108</sup>.

### 1.3.1 Le remodelage via les complexes ATP-dépendants

Le remodelage de la chromatine est un mécanisme dépendant de l'ATP, aboutissant à une modification de l'organisation nucléosomale. Ce processus est orchestré par la superfamille des ATPases SNF2<sup>15</sup>. Ces enzymes permettent principalement un repositionnement de l'octamère d'histone par rapport à l'ADN (glissement), un remplacement, en partie ou en totalité de l'octamère (échange) ou un retrait, partiel ou total de l'octamère (éjection)<sup>48</sup>. Ces événements mènent à l'exposition d'éléments de régulation présents sur l'ADN.

Tel que résumé par Clapier *et al*, il existe quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine, soit les familles SWI/SNF, ISWI, CHD et INO80<sup>27</sup>. Ces complexes utilisent tous l'ATP pour altérer les contacts ADN-histone et partagent des domaines ATPase similaires. Bien que tous ces complexes aient de l'affinité pour les nucléosomes et reconnaissent les modifications covalentes d'histones, ces familles sont spécialisées et ont des rôles biologiques distincts. Cette distinction est reflétée par des domaines catalytiques et des sous-unités caractéristiques. Les fonctions principales de ces complexes sont 1) d'organiser la chromatine en assurant une distance consistante entre les nucléosomes, 2) de restreindre/favoriser son accessibilité par des mouvements ou le retrait des nucléosomes et 3) de restructurer la chromatine en y insérant des variants d'histones à des régions spécialisées.

Ainsi, le remodelage de la chromatine a un rôle de premier plan dans la régulation de la transcription des gènes. Par exemple, les séquences d'ADN situés aux régions promotrices sont généralement des régions pauvres en nucléosomes : ces régions sont riches en résidus AT, ce qui replie l'ADN de manière défavorable et crée une région appauvrie en nucléosomes d'environ 100 paires de bases, située au TSS<sup>143</sup>. À l'inverse, les enhancers peuvent être enroulés dans les nucléosomes et inaccessibles aux protéines régulatrices. Dans les deux cas, ces régions nécessitent un remodelage pour favoriser ou restreindre l'exposition des sites de liaison de facteurs de régulation.

De manière générale, les complexes de remodelage répressifs favorisent l'assemblage de la fibre de chromatine, restreignant ainsi son accessibilité aux facteurs s'y liant et recrutent des molécules qui amplifient cette répression. À l'inverse, la transition à l'état actif de la transcription d'un gène est accompagnée par la perte de nucléosomes ainsi que par des mouvements de nucléosomes. La logique derrière l'activation par les complexes de remodelage est de mouvoir, de restructurer ou d'éjecter les nucléosomes afin d'exposer l'ADN, facilitant ainsi la liaison de facteurs activateurs supplémentaires aux régions distales ou facilitant la liaison de la machinerie transcriptionnelle aux promoteurs en agrandissant la région appauvrie en nucléosomes<sup>83</sup>. Il existe ainsi un effet antagoniste entre les complexes qui assemblent et les complexes qui déstabilisent la chromatine. Cette dualité permet d'établir un flux dynamique

d'assemblage/désassemblage qui est utilisée dans la régulation de la transcription des gènes.

### **1.3.2 L'incorporation des variants d'histones**

L'organisation de l'ADN en fibre de chromatine est inhibitrice à tous processus nécessitant l'ADN comme matrice, tels que la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation. Plusieurs mécanismes sont mis en place par la cellule afin de manipuler la structure et la composition de la chromatine, dans le but de faciliter ces processus. Ces mécanismes incluent l'incorporation de variants d'histones<sup>63</sup>. Les cellules eukaryotes contiennent des variants d'histones H2A et H3 qui peuvent être distingués des histones canoniques par des différences au niveau de la séquence d'acides aminés<sup>91</sup>. À l'opposé des histones canoniques, les variants d'histones sont synthétisés et assemblés dans les nucléosomes indépendamment de la réplication de l'ADN, ce qui suggère que ces derniers génèrent et maintiennent des régions spécialisées dans la chromatine<sup>71</sup>.

#### **1.3.2.1 Les variants de l'histone H2A**

L'histone canonique H2A possède plusieurs variants, mais ce sont les variants H2A.Z et H2A.X qui sont les mieux caractérisés.

Le variant H2A.Z constitue environ 10% des histones H2A<sup>113</sup>. Ce variant participe à la régulation de l'expression des gènes en déstabilisant l'association des dimères (H2A.Z-H2B) et (H3-H4), facilitant ainsi l'accessibilité des facteurs de régulation à la chromatine<sup>131</sup>. Des études ont démontré son rôle dans la régulation de la transcription des gènes chez les eukaryotes<sup>53 52</sup>. Chez la levure, une délétion du variant H2A.Z est associée avec un défaut de recrutement de la machinerie transcriptionnelle à des régions favorables à la transcription<sup>2</sup>.

Le variant H2A.X est retrouvé exclusivement chez les eukaryotes supérieurs. La phosphorylation de la sérine S139, située à l'extrémité C-terminale du variant H2A.X,

est impliquée dans les processus de réparation des bris d'ADN double brins<sup>113</sup> et dans le processus d'apoptose<sup>84</sup>. Des études ont démontré le rôle de ce variant dans la condensation des chromosomes X et Y lors de la méiose<sup>45</sup>.

### 1.3.2.2 Les variants de l'histone H3

Il existe 4 isoformes de l'histone H3, dont H3.3 est le mieux caractérisé. Les nucléosomes contenant le variant H3.3 sont particulièrement moins stables, car ce variant semble supprimer la compaction induite par l'histone de liaison H1 en empêchant son recrutement<sup>70 17</sup>. Des études démontrent également que ce variant est présent aux régions active à la transcription<sup>3</sup>.

### 1.3.3 Les modifications post-traductionnelles des histones

La chromatine, matrice de l'information génétique chez les eukaryotes, est sujette à plusieurs modifications post-traductionnelles<sup>68</sup>. Ces modifications prennent place sur les acides aminés situés aux extrémités NH<sub>2</sub>-terminales protubérantes (queues) des histones, ce qui a pour effet de réguler l'accessibilité à l'ADN. Différentes modifications, aussi appelées marques, à ces extrémités peuvent générer des interactions synergiques ou antagonistes avec des protéines régulatrices qui provoquent une transition dynamique entre l'état répressif et permissif de la chromatine. L'ajout de ces marques sur les histones donne naissance au concept du code des histones. Ce code multiplie littéralement le potentiel informatif du code génétique, ouvrant la voie sur la notion d'épigénétique ou de code épigénétique<sup>68</sup>. L'épigénétique se définit ainsi comme l'ensemble des informations qui complexifient le génome sans en modifier la séquence d'ADN.

La partie NH<sub>2</sub>-terminale des histones subit des modifications covalentes, incluant la méthylation, la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation, permettant de moduler l'état transcriptionnel de l'ADN. Les enzymes en charge de modifier les queues d'histones sont hautement spécifiques à une position et à un acide aminé précis<sup>129; 133</sup>. Bien que la majorité de ces modifications ainsi que leur rôle ne soit

pas encore parfaitement compris, beaucoup de progrès ont été accomplis dans la compréhension de l'acétylation et de la méthylation des résidus lysine.

### **1.3.3.1 L'acétylation de l'ADN**

De toutes ces modifications, l'acétylation des histones de même que les enzymes responsables de l'ajout et du retrait de cette marque, les histone-acétyltransférases (HATs) et les histone-déacétylases (HDACs), ont été les plus étudiées<sup>59</sup>. Des évidences démontrent que l'acétylation de certains résidus lysines jouent un rôle fondamental dans la régulation de la transcription des gènes. En effet, en 1964, Allfrey proposa que l'acétylation des histones est en lien avec le status transcriptionnel des gènes chez les cellules eukaryotes<sup>5</sup>. Il a été ainsi démontré que les histones acétylés étaient associées préférentiellement avec la chromatine transcriptionnellement active. L'acétylation prend place sur les résidus lysine situés sur les queues d'histones et neutralisent la charge positive de ces dernières, ce qui décroît leur affinité pour l'ADN chargé négativement. En conséquence, l'acétylation des histones altère la stabilité nucléosomale, ce qui facilite l'accessibilité des protéines régulatrices à l'ADN<sup>130</sup>. L'acétylation permet également le recrutement d'enzymes à des régions spécifiques du génome. En effet, les lysines acétylées sont reconnues par les bromodomains présents dans les complexes de remodelage ATP-dépendants.

### **1.3.3.2 La méthylation des histones**

La méthylation des lysines peut avoir différents effets selon la lysine modifiée. Par exemple, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) ainsi que de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36) sont associés à la chromatine transcriptionnellement active. Au contraire, la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9, H3K27) ainsi que la méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20) corrélerent habituellement avec la répression des gènes. La méthylation des histones, tout comme l'acétylation, permet le recrutement de complexes protéiques à des régions cibles du génome. Une interaction entre H3K4 méthylé et le chromodomaine Chd1 permet le recrutement de complexes activateurs sur la chromatine<sup>111</sup>. À l'opposé, les marques de méthylation sur les lysines

H3K9 et H3K27 sont liées par les chromodomaines HP1 et polycomb, respectivement, ce qui abouti à la compaction de la chromatine<sup>93</sup>. Un résidu lysine peut avoir jusqu'à trois groupes méthyl et cet état de méthylation (mono-, di- ou tri-) influence la liaison aux chromodomaines. Polycomb interagit préférentiellement avec les résidus tri-méthylés H3K27, alors que HP1 démontre une préférence pour les résidus H3K9 di- ou tri-méthylés<sup>47</sup>.

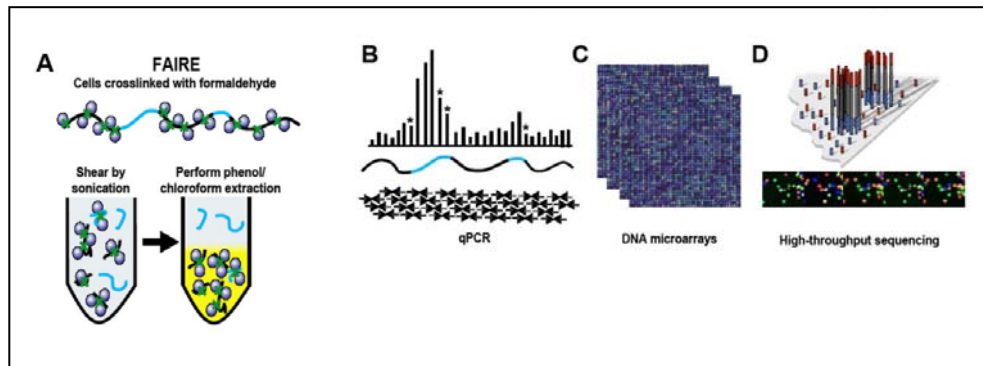
## **2. Éléments de régulation et signature chromatinienne**

Les mécanismes de remodelage de la chromatine, d'incorporation de variants d'histone de même que les modifications covalentes des histones établissent une signature chromatinienne bien distincte, permettant de reconnaître des éléments de régulation présents dans le génome<sup>8; 62; 40</sup>. Par exemple, les régions génomiques directement impliquées dans la régulation transcriptionnelle peuvent être retracées par des particularités de leur structure chromatinienne. En effet, des études portant sur les séquences contenant des sites de liaison de protéines régulatrices ont révélées que ces régions étaient soit appauvrit en nucléosomes ou avaient des interactions ADN-nucléosomes altérées<sup>46; 49</sup>. De plus, tel que mentionné précédemment, certaines marques épigénétiques et l'incorporation de variants d'histones sont des éléments typiques de régions favorables à la transcription<sup>11</sup>. L'exclusivité de toutes ces caractéristiques permet d'exploiter ce système dans le but d'isoler et d'identifier les éléments de régulation qui les portent à travers le génome d'un type cellulaire d'intérêt, afin de mieux en comprendre les propriétés et les fonctions.

### **2.1 Signature chromatinienne et identification des éléments de régulation**

L'activité des facteurs de régulation aux promoteurs et aux enhancers cause typiquement une éviction des nucléosomes chez les cellules eukaryotes<sup>16</sup>. Ainsi, l'isolation de régions appauvries en nucléosomes permet de découvrir des éléments de régulation de la transcription présents dans le génome. Cette tâche peut être accomplie par digestion enzymatique à la DNase I<sup>125; 16</sup>. En 2007, Giresi et Lieb ont proposé une méthode alternative dans le but de détecter les régions ouvertes présentes dans la chromatine chez

les eukaryotes, technique connue sous le nom de FAIRE (formaldehyde- assisted isolation of regulatory elements) et schématisée à la figure 3A<sup>54; 55</sup>. Contrairement à la digestion enzymatique, cette technique ne requiert pas l'utilisation d'enzymes, mais est plutôt basée sur les différences d'efficacité de pontages chimiques entre l'ADN et les nucléosomes versus l'ADN et les protéines régulatrices. Le pontage chimique entre l'ADN et les protéines régulatrices est beaucoup moins efficace que le pontage entre l'ADN et les nucléosomes. Ainsi, les complexes ADN-protéines régulatrices se retrouveront dans la phase aqueuse suite à une extraction phénol/chloroforme, contrairement aux pontages ADN-nucléosomes qui se retrouveront dans la phase organique, permettant ainsi d'isoler les régions régulatrices présentes dans le génome. Afin de réaliser une expérience de FAIRE, les cellules ou tissus doivent être préalablement fixés avec le formaldéhyde pour établir le pontage chimique des complexes ADN-protéines. Les cellules sont ensuite lysées afin d'en recueillir la chromatine, qui sera alors fragmentée par sonication. Les fragments ainsi obtenus seront soumis à une extraction phénol/chloroforme. L'ADN se trouvant dans la phase aqueuse est alors purifié et analysé. Plusieurs options sont possibles afin d'analyser les fragments enrichis, tel qu'une amplification quantitative par réaction de polymérase en chaîne, PCR (FAIRE-qPCR), une hybridation sur puce (FAIRE-chip) ou un séquençage haut-débit (FAIRE-seq) (Figure 3B-D). La première approche nécessite une connaissance préalable des régions ouvertes sur la chromatine, alors que les deux dernières permettent de découvrir de nouvelles régions régulatrices d'un type cellulaire d'intérêt.



**Figure 3) Procédure FAIRE.**

La procédure FAIRE décrite dans le texte est schématisée en **A**). L'ADN recueilli de la phase aqueuse suite à l'extraction phénol/chloroforme peut être utilisé pour identifier des régions régulatrices présentes dans la chromatine en utilisant la qPCR, une hybridation sur puce ou le séquençage haut-débit. **B**) pour le qPCR, une série d'amorces est utilisée afin de couvrir une région génomique d'intérêt. Les sites correspondant à des éléments de régulation sont identifiés en bleu et démontrent un enrichissement plus important. **C**) Une puce regroupant des oligonucléotides de 50-70pb correspondant à des régions d'intérêt ou au génome entier d'un organisme est utilisé pour l'hybridation des séquences obtenues par FAIRE. **D**) Le séquençage haut-débit peut être utilisé afin d'aligner les fragments d'ADN générés par FAIRE sur un génome de référence. Image adaptée de Gaulton *et al.*, 2010<sup>51</sup>

Comme la technologie FAIRE-seq permet la découverte de régions régulatrices qui sont essentielles à la régulation transcriptionnelle cellule spécifique, cette méthode a été employée afin de découvrir des éléments clés de la fonction ovarienne chez la souris. En effet, cette étude a été entreprise dans le but de découvrir des événements clés, prenant place au cours du moment critique du cycle ovarien qui est induit par le stimulus ovulatoire, précédant l'ovulation et la différenciation cellulaire et menant à la formation du corps jaune.

### 3. La biologie de l'ovaire

Le mot ovaire est dérivé du mot latin « ovum » qui signifie œuf. Chez les mammifères, l'ovaire n'est pas seulement une réserve d'œufs, ou de cellules germinales produisant une descendance, mais également une glande contrôlant divers aspects du développement et de la physiologie femelle<sup>38</sup>. Un rôle fondamental de l'ovaire est ainsi de produire des molécules actives, telles que des stéroïdes, notamment les oestrogènes et la progestérone, mais aussi des facteurs de croissance qui sont essentiels à la fonction ovarienne, la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique ainsi qu'au



développement de caractéristiques sexuelles femelle. La production de ces molécules est finement contrôlée par un programme de différenciation cellulaire qui prend place au cours du processus de la folliculogénèse.

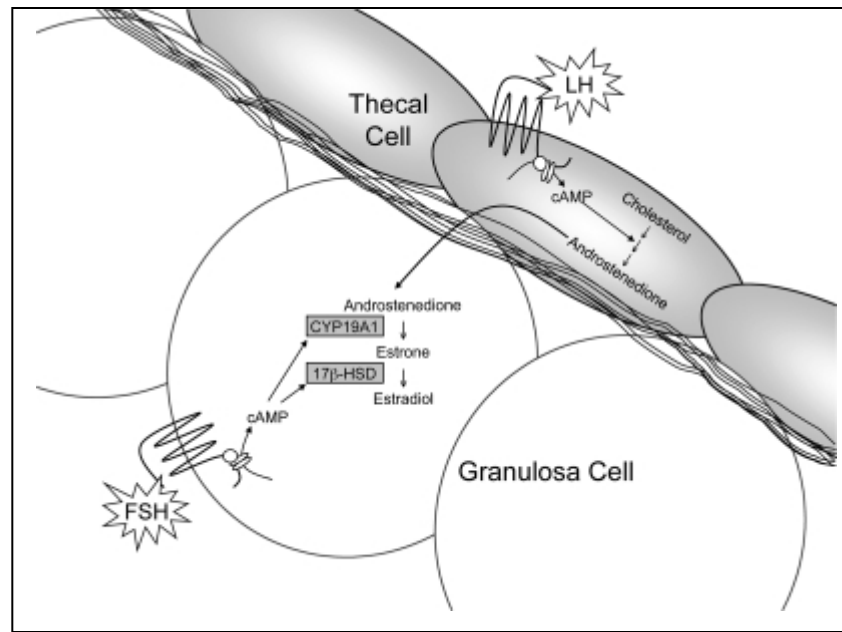
### **3.1 La réponse des cellules somatiques aux gonadotrophines**

La fonction ovarienne est régulée par une multitudes de facteurs, dont les plus connus sont la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone), qui sont des gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse en réponse à la GnRH hypothalamique<sup>114</sup>. Ces gonadotrophines sont indispensables au développement folliculaire et à la stéroïdogénèse ovarienne. C'est par leur réponse aux gonadotrophines que la fonctionnalité des follicules ovariens évolue au cours de leur croissance. Cette fonctionnalité se traduit premièrement par l'acquisition de la réceptivité aux facteurs régulateurs que sont les gonadotrophines et les stéroïdes, par l'aptitude à produire des facteurs locaux qui modulent la fonction gonadique et par l'acquisition d'une stéroïdogénèse fonctionnelle.

Les gonadotrophines agissent sur les cellules somatiques du follicule en se liant à des récepteurs membranaires. Le récepteur pour la FSH, FSHR est présent à la surface des cellules de granulosa très tôt durant la folliculogénèse. Le récepteur pour la LH, LHR, est plutôt situé sur les cellules de la thèque interne à partir du stade préantral et le nombre de récepteurs présent à la surface d'un follicule augmente avec sa taille<sup>98</sup>. Ils apparaissent sur les cellules de granulosa du follicule au stade préovulatoire. Sous l'effet des gonadotrophines, le follicule produit des hormones stéroïdiennes selon la théorie « deux cellules, deux gonadotrophines » : sous le contrôle de la FSH, les cellules de granulosa aromatisent en estrogènes les androgènes produits par la thèque interne sous l'effet de la LH (Figure 4)<sup>82</sup>.

Les cellules de granulosa produisent l'estradiol, mais chez la majorité des espèces, elles sont dépourvues de l'enzyme CYP17A1, nécessaire à la production du précurseur aromatisable de l'estradiol et des androgènes, l'androstenedione. Bien que les cellules de la thèque expriment cet enzyme, elles sont déficientes en CYP19A1, l'enzyme clé de la

conversion de l'androstenedione en oestrogènes, qui est exprimé par les cellules de granulosa<sup>44</sup>. L'expression de ces enzymes est contrôlée par les gonadotrophines, formant la base du modèle de production de l'estradiol<sup>89</sup>.



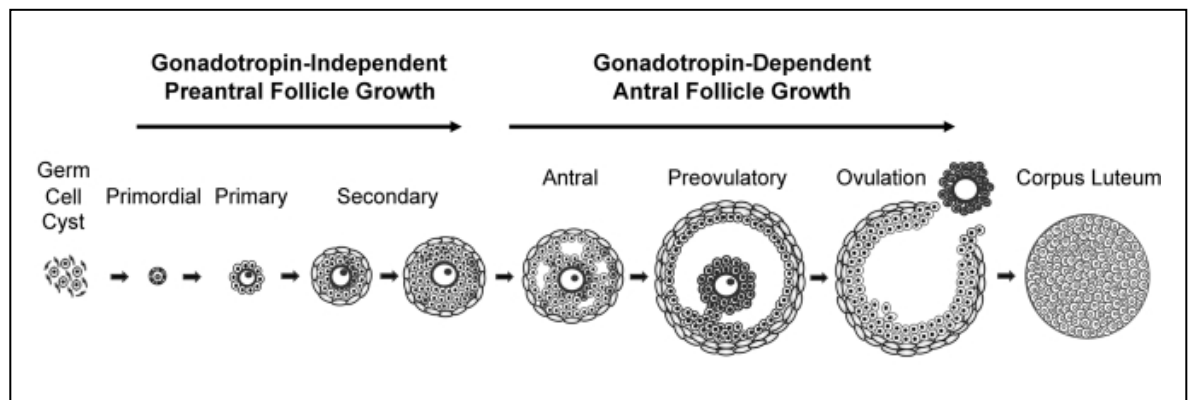
**Figure 4) Le concept deux cellules, deux gonadotrophines de la production de l'estradiol.**

La fonction principale des cellules de la thèque durant la folliculogénèse est la production de stéroïdes. Bien que les cellules de la thèque aient la capacité de produire des androgènes *de novo*, elles sont dépourvues de l'aromatase (CYP19A1), enzyme requise pour convertir les androgènes en estradiol. Les cellules de la thèque répondent au niveau de base de LH en surexprimant les enzymes impliqués dans la production de stéroïdes, incluant STAR, CYP11A1, CYP17A1 et 3β-HSD. STAR permet le transport du cholestérol à la membrane interne des mitochondries, où il est converti en pregnenolone par CYP11A1. La pregnenolone est converti en dehydroépiandrosterone (DHEA) par CYP17A1. Finalement, 3β-HSD converti le DHEA en androstenedione, qui diffuse à travers la membrane des cellules de granulosa. En réponse à la stimulation par la FSH, les cellules de granulosa surexpriment CYP19A1 et 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD), qui convertissent l'androstenedione en estradiol. Image tirée de Edson *et al.*, 2009<sup>38</sup>.

### 3.2 La folliculogénèse

La folliculogénèse est un processus qui prend place à l'intérieur des follicules, structures composées de cellules somatiques spécialisées, retrouvées dans l'ovaire. Ainsi, le développement folliculaire est une succession d'étapes finement régulées, caractérisée

par une croissance et une différenciation des cellules somatiques des follicules et qui aboutit en la croissance et la différenciation de l'oocyte, qui mature pour devenir fécondable<sup>12</sup>. La folliculogénèse dépend largement de l'effet des gonadotrophines circulantes sur la prolifération et la différenciation des cellules de granulosa et de la thèque, qui sont les deux types cellulaires somatiques principaux du follicule. C'est ainsi que la réponse des cellules somatiques aux gonadotrophines orchestre la folliculogénèse en différentes étapes : la formation des follicules primordiaux, le recrutement des follicules primordiaux, la phase préantrale, la phase antrale, la phase préovulatoire, l'expansion du cumulus/l'ovulation et finalement la formation du corps jaune (Figure 5).



**Figure 5) Les stades de la folliculogénèse chez les mammifères.**

Chez la souris, les follicules primordiaux se forment 1 ou 2 jours suivant la naissance. Les follicules préantraux commencent leur développement dans la vie postnatale. Le développement folliculaire préantral ne nécessite pas de stimulation hypophysaire par les gonadotrophines. Au stade secondaire, une couche additionnelle de cellules somatiques apparaît sur le follicule, il s'agit de la thèque. À la puberté, la FSH sécrétée par l'hypophyse promeut la prolifération et la survie des cellules de granulosa. L'ovulation du follicule dominant a lieu en réponse au pic sécrétoire de LH. Après l'ovulation, les cellules de granulosa et de la thèque subissent une différenciation terminale afin de former le corps jaune. Image tirée de Edson *et al.*, 2009<sup>38</sup>.

Avant la formation des follicules primordiaux, les oocytes sont présents dans la gonade sous la forme d'amas de cellules germinales. La formation des follicules primordiaux prend place lorsque les oocytes survivent au bris de l'amas de cellules germinales et sont individuellement enrobés par des cellules de pré-granulosa aplaties. Cette étape correspond à la première étape de la folliculogénèse et se produit dans les jours suivant la naissance chez la souris<sup>65</sup>. Chez les mammifères, cette population de follicules

primordiaux sert de réserve définitive d'oocytes qui seront disponibles et sélectionnés à travers la vie reproductive chez la femelle.

### **3.2.1 Recrutement initial des follicules primordiaux**

Le recrutement folliculaire est généralement subdivisé en deux catégories : soit 1) l'activation initiale d'une cohorte de follicules primordiaux, qui survient tout au long de la vie reproductive et 2) l'activation cyclique, après la puberté, d'un nombre limité de follicules à partir de la cohorte précédente, desquels une mince fraction seront sélectionnés pour l'ovulation<sup>95</sup>. La transition d'un follicule primordial à un follicule primaire est caractérisée par des changements morphologiques des cellules de granulosa qui passent d'aplaties à cuboidales.

### **3.2.2 La phase préantrale**

Cette phase est caractérisée par la croissance de l'oocyte, la prolifération des cellules de granulosa et l'acquisition d'une couche additionnelle de cellules somatiques, nommée thèque. La croissance des follicules préantraux, chez la souris, débute 10-12 jours après la naissance, alors qu'une cohorte de follicules en développement atteint le stade de follicules secondaires. La croissance des follicules préantraux est dépendante de facteurs autocrines et paracrines, mais semble indépendante des gonadotrophines. En effet, des souris génétiquement modifiées déficientes en FSH $\beta$ <sup>74</sup> ou en FSHR<sup>36; 1</sup>, de même que des souris possédant des mutations de GnRH, marquées par une nette réduction de synthèse des gonadotrophines FSH et LH<sup>24</sup>, ont une formation de follicules préantraux normale malgré une folliculogénèse antrale défectueuse.

### **3.2.3 La phase antrale**

Plusieurs changements importants prennent place lors de la formation de l'antra, qui est une caractéristique spécifique des follicules antraux. De petits espaces remplis de liquides se regroupent afin de former une seule cavité qui sépare les cellules de granulosa en deux populations distinctes. Les cellules de granulosa murales qui tapissent

le contour du follicule et sont des joueurs clés dans la stéroïdogénèse et l'ovulation, alors que les cellules de granulosa du cumulus entourent étroitement l'oocyte et sont en charge de promouvoir sa croissance et ses compétences développementales. Ces deux types cellulaires semblent être définis par des gradients opposés de FSH en provenance de l'extérieur du follicule de même que par des facteurs sécrétés par l'oocyte<sup>35</sup>. La transition du stade préantral au stade antral marque un changement fondamental de régulation, puisque l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique commence à fonctionner. La FSH devient alors essentielle afin de prévenir l'apoptose et l'atrésie des follicules<sup>74; 26</sup>, ainsi que pour promouvoir la prolifération des cellules de granulosa, la production d'estradiol et l'expression du récepteur de la LH<sup>114</sup>. La réponse folliculaire à la FSH dépend du seuil de sensibilité du follicule, qui varie avec la taille de celui-ci.

La cascade de signalisation activée par la liaison de la FSH à son récepteur, FSHR, est une cascade linéaire AC/cAMP/PKA qui résulte en la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription contenant des cAMP-response element-binding (CREB), qui régulent la transcription d'un grand nombre de gènes cibles, incluant l'aromatase, l'inhibine alpha et beta ainsi que le récepteur LHR<sup>100; 56</sup>. L'activation de ces gènes se traduit par une élévation de l'estradiol et de l'inhibine, qui rétrocontrôlent négativement la production de FSH.

### **3.2.4 Formation des follicules préovulatoires**

Bien que la majorité des follicules en croissance seront soumis à l'atrésie, une petite quantité de follicules antraux de la cohorte en développement atteindra le stade de follicule préovulatoire chez la souris. Les follicules qui survivent à cette étape sont plus sensibles aux niveaux décroissant de FSH circulante, qui survient lors du rétrocontrôle négatif de l'estradiol et de l'inhibine sur l'hypophyse. Cette sensibilité accrue s'explique par une plus grande expression de récepteur à la FSH, FSHR<sup>114</sup>. Alors que des concentrations croissantes en estradiol permettent de supprimer les sécrétions hypophysaires de FSH, l'augmentation de la production d'estradiol intrafolliculaire permet de promouvoir la production de LH hypophysaire, résultant en un pic de LH. Les follicules préovulatoires expriment le récepteur de la LH, LHR, à forte concentration

dans les cellules de granulosa, leur permettant ainsi de répondre au pic de LH, ce qui initie une cascade d'événements menant à la résomption de la méiose de l'oocyte, à l'expansion des cellules du cumulus, à la rupture folliculaire et finalement en une différenciation cellulaire terminale des cellules de granulosa et de la thèque afin de former le corps jaune<sup>75</sup>. Les voies de signalisation induites par le pic sécrétoire de LH affectent rapidement et définitivement le profil transcriptionnel des cellules de granulosa, reprogrammant ainsi leur fonctions cellulaires<sup>120</sup>. Comme le récepteur pour la FSH, le récepteur de la LH active la voie AC/cAMP/PKA, résultant en une augmentation drastique de l'AMPc intracellulaire<sup>94; 114</sup> et en une activation des CREB. Le pic de LH est reconnu pour stimuler des voies de signalisation additionnelles en augmentant la production d'inositol tri-phosphate (IP3) dans les cellules de granulosa<sup>33</sup> et en stimulant les voies des kinases extracellulaire ERK1/2 et MAPK<sup>32; 90; 122; 25</sup>.

### 3.2.5 Expansion du cumulus

Suivant le pic sécrétoire de LH, les cellules de granulosa du cumulus produisent une matrice extracellulaire qu'elles utiliseront afin de se dissocier de l'oocyte, phénomène connu sous le nom d'expansion du cumulus<sup>41</sup>. L'expansion des cellules du cumulus est initiée par le pic de LH et ce processus est essentiel à l'ovulation et à la fertilisation<sup>39</sup>. La régulation de ce processus est dépendante de l'activation des MAPK<sup>43</sup>, de même que par des facteurs paracrines sécrétés par l'oocyte<sup>19</sup>. Suite au pic de LH, plusieurs gènes impliqués dans la formation et la stabilisation de la matrice extracellulaire du cumulus oophorus sont surexprimés<sup>115</sup>.

Tel que mentionné précédemment, deux populations de cellules de granulosa existent dans le follicule antral. Étrangement, les cellules de granulosa murales tapissant le follicule exprime LH-R, mais les cellules du cumulus sont dépourvue de ce récepteur chez la souris<sup>107; 35</sup>. Conti *et al*<sup>105</sup>, ont démontré que le pic de LH cause une augmentation rapide des membres de la famille EGF-like *Areg*, *Ereg* et *Btc* (amphireguline, epireguline et betacelluline, respectivement), spécifiquement dans les cellules de granulosa murales des follicules préovulatoires. Ces ligands sont synthétisés en tant que protéines membranaires et sont relâchées de la surface par clivage

protéolytique. Ils se lient et activent ensuite des récepteurs tyrosine kinase EGFR exprimés à la surface des cellules du cumulus. Cette étude démontre que tous ces facteurs de croissance stimulent l'expansion du cumulus et la maturation oocytaire *in vitro* de manière dépendante de EGFR. Les effets de ces facteurs *EGF-like* sont causés par l'expression de *Ptgs2*, *Has2* et *Tnfrsf10b*<sup>105</sup>, dont les produits sont essentiels à la formation et la stabilisation de la matrice extracellulaire du cumulus oophorus. Après 4h de stimulation avec l'analogue de la LH, hCG, les transcrits de *Areg*, *Ereg* et *Btc* sont détectables dans les complexes cumulus-oocyte, suggérant qu'une boucle de régulation autocrine est établie pour maintenir l'expression des facteurs *EGF-like* dans les cellules du cumulus<sup>64</sup>.

### 3.2.6 La lutéinisation : formation du corps jaune

Une fois que le follicule est rompu et que le complexe cumulus-oocyte est relâché, le destin final des cellules de granulosa et de la thèque est une différenciation cellulaire afin de former le corps jaune, structure endocrine hautement spécialisée, sécrétant la progestérone dans le but de stimuler l'utérus et de maintenir une gestation potentielle<sup>70</sup>. Remarquablement, la transformation des cellules de granulosa en cellules lutéales s'effectue en quelques heures suivant le pic de LH<sup>117</sup>.

Plusieurs changements génomiques et structuraux mènent à la différenciation terminale des cellules folliculaires en cellules lutéales. D'une part, ces dernières cessent de se diviser et commencent à exprimer un nouvel éventail de molécules qui leur permettront de s'adapter à un environnement hormonal différent et d'assurer de nouvelles fonctions<sup>128</sup>;<sup>34</sup>. D'autre part, la formation du corps jaune nécessite des changements structuraux qui permettent la migration des cellules à travers le follicule et la vascularisation du corps jaune nouvellement formé. Pendant la différenciation des cellules lutéales, des altérations profondes se produisent au niveau tissulaire. Ceux-ci incluent des changements dans la matrice extracellulaire (ECM), un système complexe composé d'un réseau de collagène associé à des protéoglycans et des glycoprotéines<sup>66</sup> qui joue un rôle structural dans le support et la division des composantes du corps jaune. Le remodelage de cette matrice est finement régulé par l'interaction entre des protéases et leurs inhibiteurs. Les composants de la matrice sont clivés par des protéases extracellulaires, telles que des

sérines protéases et des métalloprotéinases matricielles (MMPs). Parmi ces dernières, MMP-2 et MMP-9 semblent avoir un rôle important pour la formation du corps jaune, en clivant le collagène de type IV, qui est la composante principale de la membrane basale des follicules<sup>85</sup>. L'activité de ces protéases est inhibée de manière spécifique par les *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMPs). Le pic de LH induit l'expression de plusieurs MMPs et TIMPs et le ratio entre les MMPs actives et leurs inhibiteurs est important afin de maintenir un microenvironnement favorable à la différenciation des cellules folliculaires en cellules lutéales<sup>31; 30</sup>.

## **4. La régulation transcriptionnelle induite par le pic de LH dans les cellules de granulosa**

### **4.1 Les membres de la famille des CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs)**

Un nombre important de régulateurs transcriptionnels est essentiel pour l'ovulation. Parmi les régulateurs transcriptionnels qui influencent le processus ovulatoire se retrouvent les membres de la famille des CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs)<sup>110; 124; 127</sup>. Cette famille est composée de quatre membres, dont les domaines de liaison à l'ADN sont de type basic leucine zipper (bzip) : C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  et CRP1/C/EBP $\epsilon$ . Ces protéines reconnaissent les mêmes séquences palindromiques sur l'ADN et se dimérisent via leur domaine bzip<sup>140</sup>. Le membre C/EBP $\beta$  a été démontré pour réguler la prolifération et la différenciation d'une grande variété de types cellulaires, ayant ainsi un rôle dans la régulation de plusieurs processus biologiques incluant l'adipogenèse<sup>78</sup>, la réponse immunitaire<sup>102</sup>, la décidualisation des cellules stromales utérines<sup>92</sup> et la différenciation de l'épithélium de la glande mammaire<sup>58; 112</sup>. Dans les follicules préovulatoires, C/EBP $\beta$  est induit par la LH<sup>124; 43</sup> et activé par une cascade de signalisation ERK1/2 dépendante<sup>43</sup>. Une déplétion du gène *Cebpb* par mutagenèse dirigée cause un phénotype anovulatoire et un défaut de lutéinisation<sup>127</sup> et la déplétion utérine de ce gène affecte les processus de décidualisation et de prolifération<sup>112</sup>. Cependant, une déplétion conditionnelle de ce gène dans les cellules de



granulosa chez la souris (cKO : *Cebpbfl/fl;Cyp19-Cre*) démontre une ovulation et lutéinisation réduites, mais pas complètement compromises, suggérant que *C/EBPβ* n'est pas la seule cible de la LH via ERK1/2 dans les cellules de granulosa, ou que d'autres membres de la famille des *C/EBPs* compensent le manque de *C/EBPβ*<sup>43</sup>. En 2011, Richards *et al* ont démontré qu'une déplétion conditionnelle double de *C/EBPα* et *C/EBPβ* dans les cellules de granulosa rend les souris complètement infertiles<sup>42</sup>. Chez les individus *Cebpa/b<sup>-/-</sup>*, les ovaires sont dépourvus de corps jaunes et les niveaux de progestérone circulante sont bas. Cette étude démontre que *C/EBPα* et *C/EBPβ* semblent dicter le processus de lutéinisation et que ces molécules sont essentielles à la différenciation terminale des cellules de granulosa en cellules lutéales.

#### **4.2 Les membres de la famille des récepteurs nucléaires NR5A**

Une délétion conditionnelle des membres de la famille des récepteurs nucléaires NR5A mène également à un phénotype anovulatoire. Le premier membre de cette famille, NR5A1 (steroidogenic factor 1;SF-1) est reconnu pour être nécessaire pour le développement et le fonctionnement normal des tissus endocrines, tels que les glandes surrénales, les gonades, les cellules gonadotrophes situées dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus ventromedial<sup>87</sup>. Les souris portant une déplétion de NR5A1 dans l'ovaire sont complètement infertiles et n'ont pas de corps jaune, suggérant que NR5A1 joue également un rôle essentiel dans le développement folliculaire<sup>69</sup>. Plus précisément, une déplétion conditionnelle de ce facteur dans les cellules de granulosa chez la souris (*SF-1fl/fl;Amhr-2/Cre*) est associée avec des ovaires hypoplasiques contenant un nombre diminué de follicules et une absence complète de corps jaune<sup>106</sup>. Ces souris démontrent également une cyclicité anormale et une quantité d'oocytes relâchée significativement diminuée suivant un protocole de superovulation standard. Une baisse importante des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire suggère que NR5A1 a un rôle clé dans la prolifération des cellules de granulosa. Cette étude démontre que l'expression de SF-1 dans les cellules de granulosa a un rôle fondamental pour la reproduction.

Plus récemment, un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires NR5A, NR5A2 (liver receptor homolog-1; LRH-1), a été identifié dans l'ovaire<sup>14</sup>.

Originellement identifié dans le foie où il régule des gènes impliqués dans la synthèse de l'acide biliaire<sup>57</sup>, ce facteur est également exprimé dans le pancréas, l'intestin, l'ovaire, et plus faiblement dans les glandes surrénales<sup>57; 123</sup>. Une déplétion conditionnelle de NR5A2 dans les cellules de granulosa chez la souris (LRH-1fl/fl;Amhr-2/Cre) cause un phénotype anovulatoire<sup>37</sup>. Les stimuli préovulatoires qui initient l'expansion du cumulus, la lutéinisation et la rupture folliculaire sont absents chez ces souris. Une augmentation de l'estradiol intrafolliculaire et une diminution de la synthèse de progestérone sont causés par une diminution de l'expression des gènes cibles de NR5A2, tels que *Nos3*, *Cyp19a1*, et *Star*. De plus, l'expression des MMPs, qui sont essentielles pour l'ovulation, est compromise. Cette étude démontre que NR5A2 régule plusieurs mécanismes essentiels à la maturation des follicules ovariens de même qu'à l'ovulation.

Plusieurs gènes et régulateurs transcriptionnels sont déjà reconnus être essentiels pour la fonction ovarienne chez la souris. Cependant, une meilleure compréhension globale des éléments de régulation variant entre les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire permettrait certainement de repérer des éléments clés, jouant un rôle fondamental dans les processus d'ovulation et de lutéinisation.

Ainsi, l'hypothèse de la présente étude est que suivant le pic de LH, une réorganisation de la structure chromatinienne survient aux régions régulatrices d'une panoplie de gènes, induisant une reprogrammation transcriptionnelle majeure qui mène à la différenciation des cellules de granulosa. Ainsi l'objectif de l'étude est d'utiliser la méthode FAIRE-seq afin d'isoler et d'identifier les éléments de régulation présents avant et après le stimulus ovulatoire, afin de repérer les éléments clés responsables des processus d'ovulation et de lutéinisation chez la souris.

## **Matériels et Méthodes**

### **1. Animaux**

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) de l'Université de Montréal et exécutées selon les directives du conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Les animaux ont été

hébergés dans un établissement contrôlé avec des cycles clarté/noirceur de 14 :10 et un accès libre à l'eau et à la nourriture. Toutes les expériences ont été réalisées avec des souris de souche B6; 129 de type sauvage.

### **1.1 Superstimulation ovarienne**

Une superstimulation ovarienne a été effectuée sur des femelles immatures (22-25 jours). Un premier groupe (n=9) a été injecté avec du pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; 5 UI) par administration intra-péritonéale, dans le but de stimuler la croissance folliculaire. Ces femelles ont été sacrifiées 48h suivant le traitement. Un deuxième groupe (n=10) a été injecté de la même façon avec du PMSG et 48h plus tard avec du human chorionic gonadotropin (hCG; 5 UI) par administration intra-péritonéale, dans le but d'induire l'ovulation. Ces femelles ont été sacrifiées 4h suivant le traitement au hCG.

### **1.2 Récolte, purification et fixation des cellules de granulosa**

Dans le but de récolter, de purifier et de fixer les cellules de granulosa, les ovaires des femelles immatures superstimulées ont été récoltés et rincés avec une solution de PBS 1x contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF 1mM, aprotinine 1 $\mu$ M, leupeptide 1 $\mu$ M et pepstatine 1 $\mu$ M). Par la suite, les ovaires ont été dégraissés et placés dans un pétri contenant 10ml de PBS 1x froid contenant des inhibiteurs de protéases. Les ovaires ont été ponctionnés à l'aide de deux seringues munies d'aiguilles 27G. Les cellules ont ensuite été filtrées sur un tamis cellulaire de 40 $\mu$ m (BD Falcon REF 352340) et centrifugées (Beckman GS-6R Centrifuge : 10 minutes, 913 x g, 4°C). Le culot cellulaire a été resuspendu et incubé dans 10ml d'une solution de PBS1x/formaldéhyde 1.1% pendant 10 minutes avec agitation. La fixation a été interrompue en ajoutant de la glycine à une concentration finale de 125mM. Suite à une centrifugation (Beckman GS-6R Centrifuge 10 minutes, 913 x g, 4°C), le culot cellulaire a été transféré dans un tube eppendorf et lavé avec 1ml de PBS 1x contenant des inhibiteurs de protéases. Après centrifugation (Fisher Scientific Micro 14 : 5 minutes, 12000 x g, 4°C), le PBS 1x a été enlevé, le tube contenant le culot cellulaire a été déposé dans l'azote liquide et conservé à -80°C pour utilisation ultérieure.

## **2. FAIRE**

### **2.1 Lyse des cellules de granulosa**

Le culot cellulaire a d'abord été décongelé sur glace et a ensuite été resuspendu dans 1ml de tampon I (0.25% triton, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Hepes pH 6.5) froid contenant des inhibiteurs de protéases et incubé 10 minutes sur glace. Après centrifugation, le culot cellulaire a été resuspendu dans 1ml de tampon II (200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Hepes pH 6.5) froid contenant des inhibiteurs de protéases et incubé 10 minutes sur glace. Après centrifugation, le culot cellulaire a été resuspendu dans 200µl de tampon de lyse SDS (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris pH 8.1) contenant des inhibiteurs de protéases et incubé 30 minutes sur glace. Le volume de l'échantillon a ensuite été ajusté à 500µl avec du tampon de dilution d'immunoprécipitation (0.01% SDS, 1.1% Triton, 1.2mM EDTA, 16.7 Tris pH 8.1 167mM NaCl) afin de faciliter la sonication.

### **2.2 Sonication de la chromatine**

Dans le but de fragmenter la chromatine, les échantillons ont été soniqués à l'aide d'un sonicateur Branson sonifier 450. Les paramètres ont été ajustés ainsi : output : 2.75, duty cycle : 90%. Les échantillons ont subi 9 cycles de 10 pulses avec une incubation de trois minutes sur glace entre chaque cycle afin d'éviter que les échantillons surchauffent. Suite à une centrifugation (Fisher Scientific Micro 14 : 10 minutes, 12000 x g, 4°C), le surnageant a été conservé et un aliquot de 10µl a été prélevé dans le but d'analyser la qualité de la sonication sur gel d'agarose. Le surnageant contenant la chromatine soluble a été conservé à -80°C pour utilisation ultérieure.

### **2.3 Extraction phénol/chloroforme**

Trois extractions subséquentes phénol/chloroforme ont été effectuées afin de recueillir un maximum d'ADN. Au volume de chromatine soluble préalablement obtenu (500µl), un volume de phénol/chloroforme (Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25 :24 :1 Fisher

bioreagents ® BP1753-100) a été ajouté. La solution a été vortexée jusqu'à ce qu'elle devienne blanche et centrifugée (Eppendorf Centrifuge 5415 D : 5 minutes, 13.4 x g, température pièce). La phase aqueuse a été conservée et une seconde extraction a été effectuée. La seconde phase aqueuse a été prélevée et transférée dans un tube « phase lock gel » (MaXtract™ Low density Cat. No. 129006) et une troisième extraction a été effectuée. La phase aqueuse a été conservée et les pontages chimiques ont été détruits par incubation à 65°C pendant 16h.

## **2.4 Purification et dosage de l'ADN**

L'ADN fragmenté a été purifié à l'aide du kit QIAquick® PCR purification (QIAGEN Cat. No. 28106). Le dosage de l'ADN a été effectué par Nanodrop.

## **3. Préparation des bibliothèques pour séquençage<sup>119</sup>**

Une quantité de 50ng d'ADN/échantillon a été utilisée pour préparer les bibliothèques.

### **3.1 End repair**

Les fragments d'ADN ont été réparés afin de produire des extrémités franches par digestion enzymatique à l'aide du End repair enzyme mix (Enzymatics Y914-HC-L). Suite à la digestion, les échantillons ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques.

### **3.2 Purification avec billes Agencourt AMPure (Beckman Coulter, A63881)**

Un ratio billes : ADN de 1, permettant la liaison des fragments plus grands que 100pb a été utilisé pour la purification. À l'aide d'un support magnétique, les billes ont été précipitées et lavées deux fois avec de l'éthanol 70%. Une fois les billes sèches, le tube a été retiré du support magnétique et les billes ont été resuspendues dans 52µl d'eau afin d'éluer les fragments d'ADN. Les billes ont ensuite été précipitées sur le support magnétique et 50µl de la solution d'ADN a été prélevée.

### **3.3 Sélection des fragments de 250 à 350 pb**

Afin de sélectionner les fragments de 250 à 350 pb, un ratio billes : ADN de 0.7, permettant la liaison et l'élimination des fragments plus grands que 400 pb a d'abord été utilisé. Suite à une incubation de 5 minutes, le tube a été placé sur le support magnétique afin de permettre la précipitation des billes. Le surnageant a été conservé. Un second ratio billes : ADN de 0.15, permettant la liaison des fragments plus grands que 150 pb a été utilisé et une purification avec billes Agencourt a été effectuée. Les billes ont été resuspendues dans 14 $\mu$ l d'eau dans le but d'éluer les fragments d'ADN. Suite à une incubation de deux minutes, le tube a été placé sur le support magnétique. Le surnageant a été conservé.

### **3.4 Ligation des linkers**

Afin que les fragments d'ADN puissent se lier à la plateforme de séquençage, des linker A0-B0 ont été ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN. Une réaction enzymatique à l'aide de la T4 DNA ligase a été effectuée (Enzymatics L603-HC-L). Par la suite, les échantillons ont été purifiés avec billes Agencourt AMPure. Les billes ont été resuspendues dans 23.5 $\mu$ l d'eau afin d'éluer les fragments d'ADN. Suite à une incubation de deux minutes sur le support magnétique, le surnageant a été conservé.

### **3.5 Nick translation**

Une réaction de marquage par translation de coupure a été effectuée sur les 21.5 $\mu$ l d'ADN issus de la réaction de ligation précédente. Une réaction enzymatique avec la Taq-B DNA polymerase (Enzymatics L603-HC-L) a été effectuée. Cette enzyme utilise comme modèle le brin complémentaire et ajoute des nucléotides à une extrémité 3'-OH du brin d'ADN (activité polymérase 5'→3').

### 3.6 Amplification

Afin d'amplifier la librairie d'ADN, une réaction de PCR a été effectuée à l'aide de l'enzyme Phusion HF (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer NEB, M0531S). Le programme d'amplification est le suivant : 98°C; 30 sec suivi de x cycles (arrêt de l'appareil dans la phase exponentielle) 98°C; 10 sec, 65°C; 30 sec, 72°C; 30 sec. Suite à l'arrêt, 72°C; 1 minute. Suite à la réaction de PCR, une purification avec billes Agencourt AMPure a été effectuée. Les billes ont été resuspendues dans 20µl d'eau afin d'éluer l'ADN et suite à une incubation de deux minutes sur le support magnétique, 18µl de surnageant ont été conservés.

La taille ainsi que la concentration des librairies ont été analysées au bioanalyzer avant d'être envoyées au séquençage.

## 4. Alignement au génome de référence et détection de signaux (peak calling)

Les séquences ont été alignées au génome de référence NCBI build 37 (mm9) en utilisant l'outil Burrows-Wheeler Alignment (BWA)<sup>77</sup>. La détection des signaux a été performée en utilisant l'outil Model-based Analysis for ChIP-Seq (MACS)<sup>144</sup> avec un false discovery rate (FDR) de  $10^{-4}$ .

## 5. Analyse bioinformatique

Les analyses subséquentes ont été performées en utilisant les outils Galaxy-Cistrome<sup>80</sup> et GREAT<sup>96</sup>.

### 5.1 Distribution des signaux FAIRE

Le diagramme de Venn, présentant la distribution des signaux FAIRE spécifiques aux cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire de même que les signaux conservés entre les deux conditions a été généré en utilisant l'outil diagramme de Venn de la section analyse intégrative. Les paramètres de base de l'outil ont été utilisés.

## **5.2 Association des signaux FAIRE à des régions spécialisées dans le génome**

Cette étude a été réalisée en utilisant la suite CEAS (Cis-regulatory Element Annotation System) de la section analyse intégrative. Plus précisément, l'outil d'enrichissement sur les chromosomes et annotation a été utilisé en conservant les paramètres proposés.

## **5.3 Analyse des processus biologiques représentés par les signaux FAIRE**

L'outil GREAT (Genomic Region Enrichment of Annotations Tool) a été utilisé dans le but de déterminer les fonctions biologiques en lien avec les éléments de régulations prédits par FAIRE. Cet outil permet d'assigner un sens biologique à des régions génomiques.

## **5.4 Recherche de motifs de facteurs de transcription**

Une analyse de motifs enrichis dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire a été performée en utilisant l'outil SeqPos sur Galaxy-Cistrome, un nouvel algorithme basé sur les travaux de Brown et Liu<sup>61</sup>. En utilisant la location génomique des signaux, SeqPos peut trouver des motifs qui sont enrichis à proximité du centre de ces signaux, aussi appelé sommet. Cet outil permet une recherche de motifs enregistrés dans les bases de données TRANSFAC<sup>141</sup>, JASPAR<sup>18</sup>, Protein binding Microarray (PBM)<sup>145</sup>, Yeast-1-hybrid (y1h) Clontech (<http://www.clontech.com>) et le human protein-DNA interaction (hPDI)<sup>142</sup>. De plus, SeqPos peut trouver des motifs *de novo* en utilisant l'algorithme MDscan<sup>81</sup> et inclus également des motifs dérivés de données publiques obtenus par ChIP-seq. Les paramètres de base suggérés par Cistrome ont été utilisés.

## **5.5 Identification de site de liaison de facteurs de transcription**

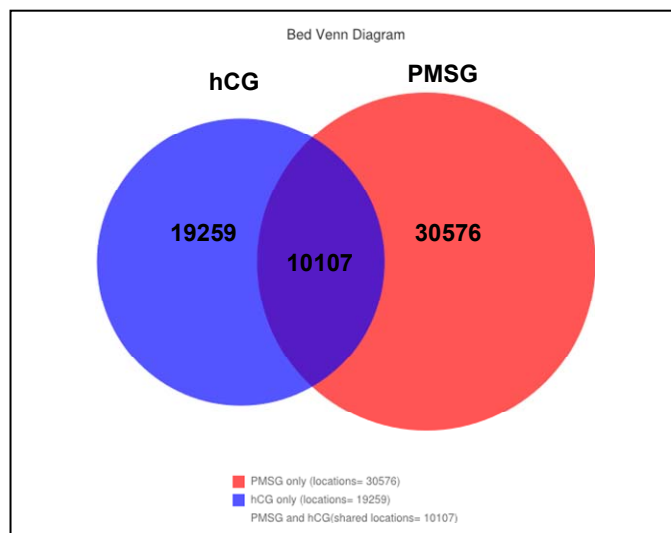


L'identification des sites de liaison des facteurs de transcription NR5A1, NR5A2, C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  a été effectuée par l'intermédiaire de l'outil MISP (Motif-based Interval Screener with PSSM) sur Galaxy-Cistrome en utilisant les paramètres de base.

## Résultats

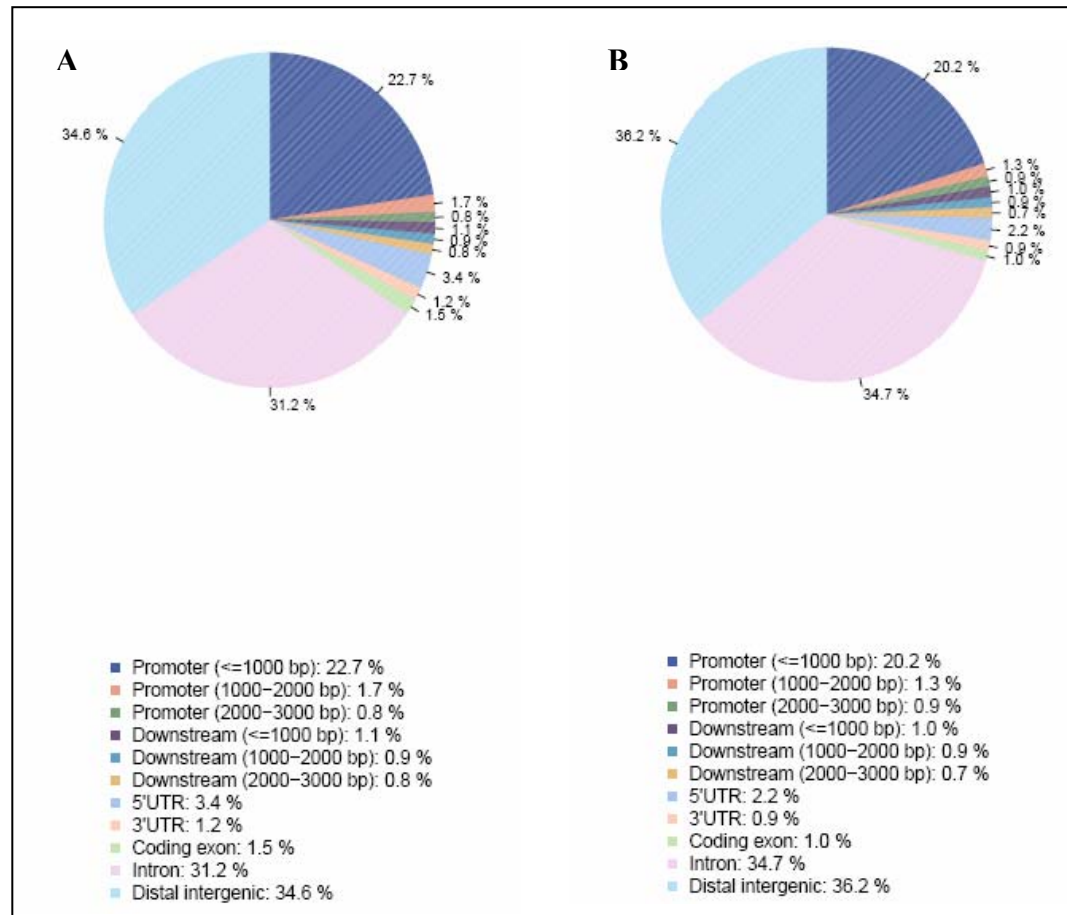
### 1. Identification des éléments de régulation, à l'échelle du génome, dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire, par FAIRE-seq

Les éléments de régulation dans le génome sont caractérisés par des structures chromatinienne accessibles et donc accessibles aux facteurs de régulation. Afin d'explorer les modifications dans l'ouverture de la chromatine induites par le stimulus ovulatoire à l'échelle du génome, un protocole de FAIRE, isolant des régions génomiques appauvries en nucléosomes<sup>55</sup>, combiné à un séquençage haut débit a été utilisé (FAIRE-seq). Cette méthode a été effectuée dans les cellules de granulosa ponctionnées à partir d'ovaires de souris avant (groupe PMSG) et après (groupe hCG) le stimulus ovulatoire. Tel que démontré dans la figure 6, cette approche a permis d'identifier 30 576 signaux FAIRE spécifiques au groupe PMSG et 19 259 signaux FAIRE spécifiques au groupe hCG. Quelques régions (10 107) démontrent un patron de signaux FAIRE conservé entre les deux traitements.



**Figure 6) Distribution des signaux FAIRE dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire.** Plusieurs (19259) signaux FAIRE sont spécifiques aux cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire (hCG) et d'autres (30576) aux cellules de granulosa avant le stimulus ovulatoire (PMSG). Certains signaux (10107) sont conservés entre les deux groupes.

Dans la figure 7, il est possible de constater que les signaux FAIRE, tant pour le groupe PMSG que hCG, se situent majoritairement à l'extérieur des promoteurs. En effet, 22.7% (PMSG) et 20.2% (hCG) des signaux se retrouvent à  $\leq 1000$ pb d'un TSS connu. La figure 2 démontre également que la majorité de ces signaux se distribuent dans des régions distales intergéniques (34.6% PMSG; 36.2% hCG) ou dans des introns (31.2% PMSG; 34.7% hCG).

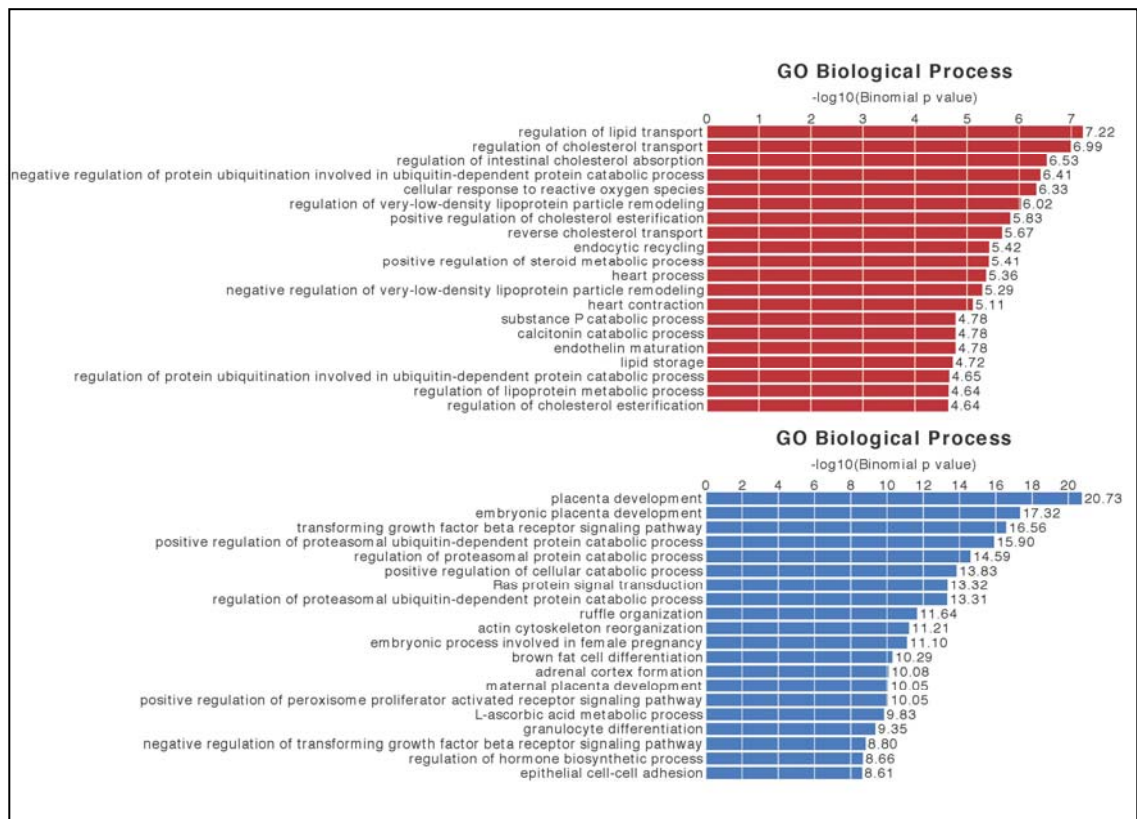


**Figure 7) Distribution des signaux FAIRE sur les régions génomiques spécialisées A) des cellules de granulosa avant le stimulus ovulatoire et B) après le stimulus ovulatoire.** Avant le stimulus ovulatoire, seulement 22.7% des signaux FAIRE sont corrélés avec des TSS connus et 20.2% après le stimulus ovulatoire. La majorité des signaux se situent sur des introns ou des régions distales intergénique dans les deux cas.

## 2. Analyse ontologique des signaux FAIRE dans les cellules de granulosa du groupe PMSG et hCG.

Par la suite, une analyse de l'ontologie des gènes a été entreprise par l'intermédiaire de l'outil GREAT (Genomic Region Enrichment of Annotations Tool)<sup>96</sup>, dans le but de déterminer quels types de processus biologiques sont associés avec les signaux FAIRE

dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire. Une soustraction des signaux conservés entre les deux conditions a été effectuée, dans le but de déterminer les processus biologiques spécifiques à chacune des conditions. La figure 8 permet de constater qu'avant le stimulus ovulatoire, des signaux FAIRE sont apparents, entre autre, aux régions régulatrices de gènes impliqués dans le transport des lipides et du cholestérol, de même qu'aux gènes impliqués dans la régulation positive du métabolisme des stéroïdes dans les cellules de granulosa. Les signaux FAIRE retrouvés après le stimulus ovulatoire sont plutôt corrélés avec des gènes impliqués, entre autre, dans le développement placentaire, la biosynthèse hormonale, la régulation de la voie TGF $\beta$  et des processus embryonnaires impliqués dans la gestation. Il est donc possible de constater que plusieurs processus biologiques sont significativement représentés dans les échantillons FAIRE de chacun des deux groupes et que ces processus sont très distincts lorsque l'on compare les deux groupes entre-eux, suggérant que le traitement avec le hCG a un impact fondamental sur la reprogrammation génique des cellules de granulosa.



**Figure 8) Analyse ontologique des signaux FAIRE des cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire.**

Les processus biologiques statistiquement significatifs représentés dans les signaux FAIRE des cellules de granulosa avant (rouge) et après (bleu) le stimulus ovulatoire. Les valeurs p sont indiquées pour chaque processus.

### 3. Groupes de gènes associés à des processus biologiques et profils FAIRE

#### 3.1 Biosynthèse et transport du cholestérol

Suite à l'analyse ontologique des signaux FAIRE, une recherche plus approfondie de groupes de gènes associée à ces processus physiologiques a été effectuée. Une étude des signaux FAIRE situés aux gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport du cholestérol a d'abord été entreprise. Comme le démontre la figure 9, un signal FAIRE est apparent à la région promotrice du gène *Hmgcr*, un gène clé de la biosynthèse du cholestérol. Ce signal est présent dans les cellules de granulosa avant et après le processus ovulatoire. Par contre, il est possible de constater que les gènes impliqués dans le transport du cholestérol, tel que *Apoa1*, *Apoa3*, *Apoa4*, *Abca1* et *Npc1* démontrent des profils FAIRE différents avant et après le stimulus ovulatoire. Par exemple, les signaux associés aux gènes *Apoa1*, *Apoa3* et *Apoa4* sont exclusivement retrouvés dans les cellules de granulosa avant le stimulus ovulatoire.

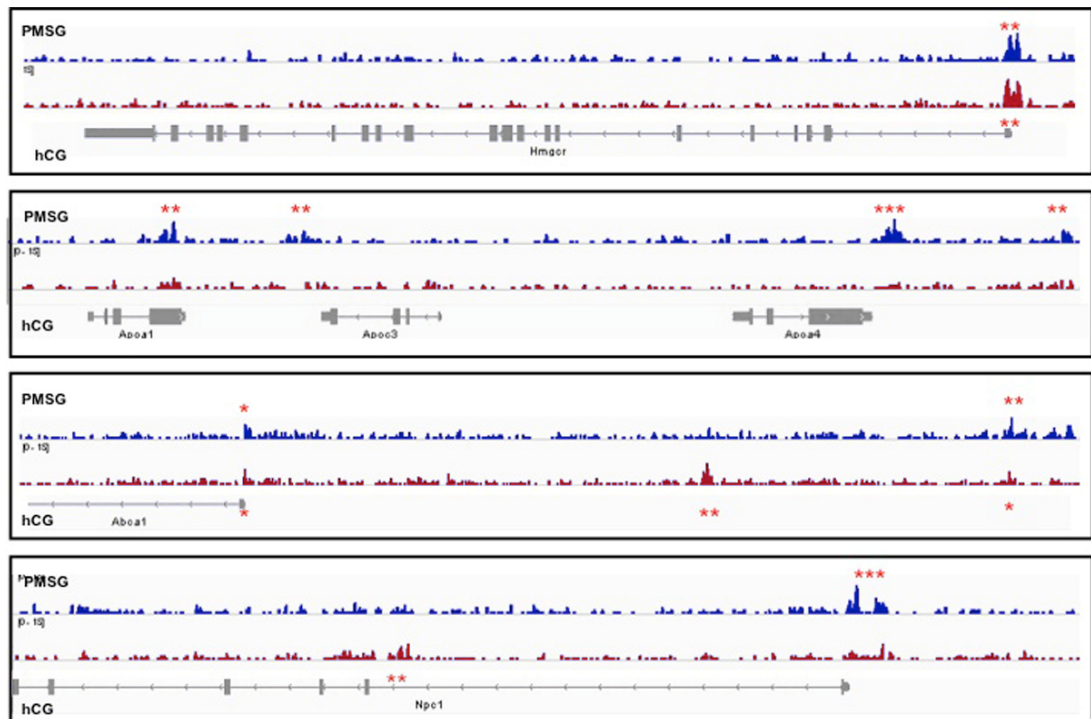
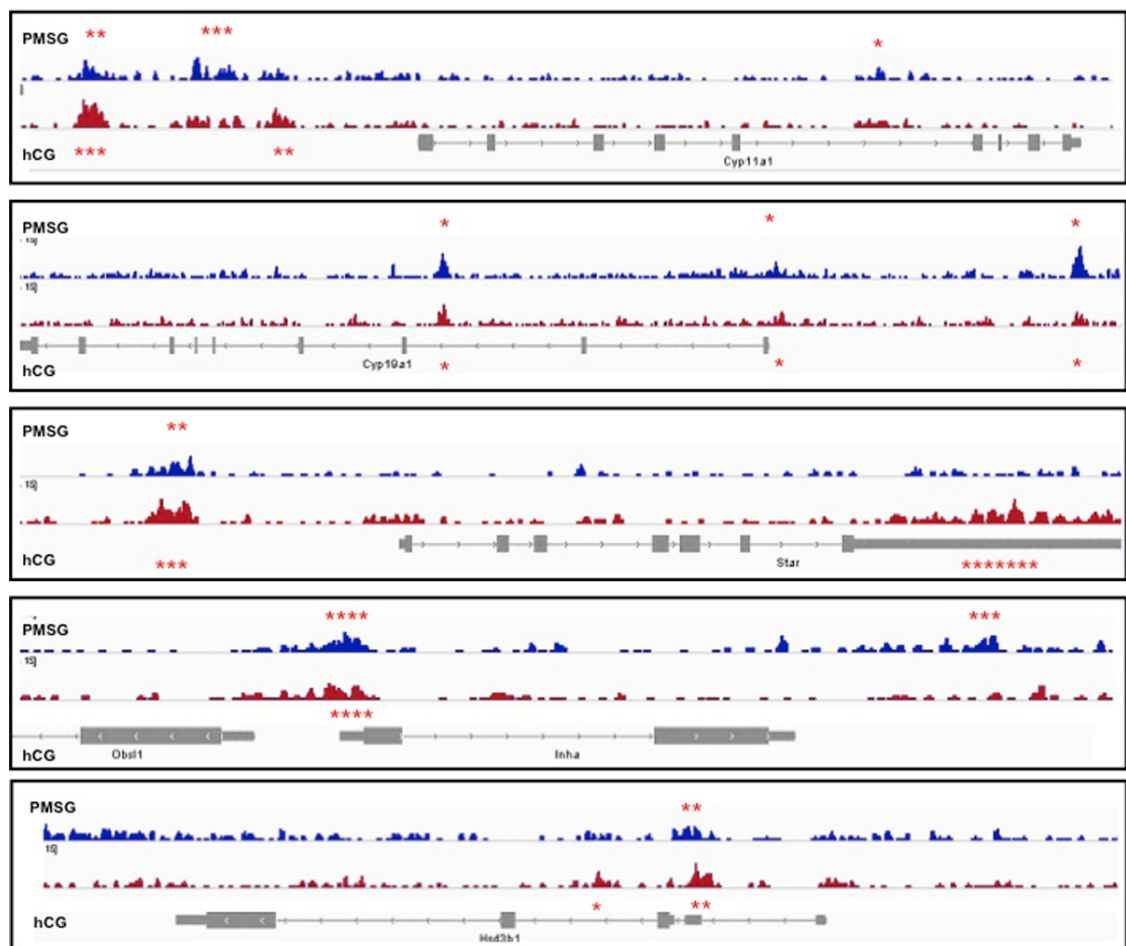


Figure 9) Profils FAIRE des gènes impliqués dans la biosynthèse (*Hmgcr*) et le transport du cholestérol (*Apoa1*, *Apoa3*, *Apoa4*, *Abca1* et *Npc1*) dans les cellules de granulosa avant (PMSG, bleu) et après (hCG, rouge) le stimulus ovulatoire. Les éléments de régulation statistiquement significatifs par rapport au bruit de fond, déterminés par l'outil de détection de signaux MACS, sont représentés par des astérisques rouges.

### 3.2 Stéroïdogenèse

En ce qui concerne les gènes impliqués dans la synthèse stéroïdienne, ce sont les gènes *Cyp11a1*, *Cyp19a1*, *Hsd3b1*, *Star* et *Inha* qui ont été étudiés. Pour chacun de ces gènes, la figure 10 démontre des régions FAIRE dans les cellules avant et après le processus ovulatoire. Ce sont surtout les signaux présents au promoteur proximal des gènes qui sont conservés entre les deux traitements, alors que des signaux présents dans la séquence codante, ou dans des régions intergéniques apparaissent de façon spécifique pour chacun des traitements.



**Figure 10) Profils FAIRE de genes impliqués dans la stéroïdogenèse (*Cyp11a1*, *Cyp19a1*, *Star*, *Inha* et *Hsd3b1*) dans les cellules de granulosa avant (bleu) et après (rouge) le stimulus ovulatoire.**

Les éléments de régulation statistiquement significatifs par rapport au bruit de fond, déterminés par l'outil de détection de signaux MACS, sont représentés par des astérisques rouges.

### 3.3 Expansion du cumulus et ovulation

Les signaux FAIRE présents aux gènes *Pgr*, *Ereg*, *Btc*, *Tnfrsf6*, impliqués dans les processus de l'expansion du cumulus et de l'ovulation ont été étudiés et le résultat est présenté à la figure 11. Tous ces gènes démontrent des signaux FAIRE qui apparaissent spécifiquement après le stimulus ovulatoire. Ces signaux se retrouvent majoritairement dans des régions intergéniques ou dans des introns.

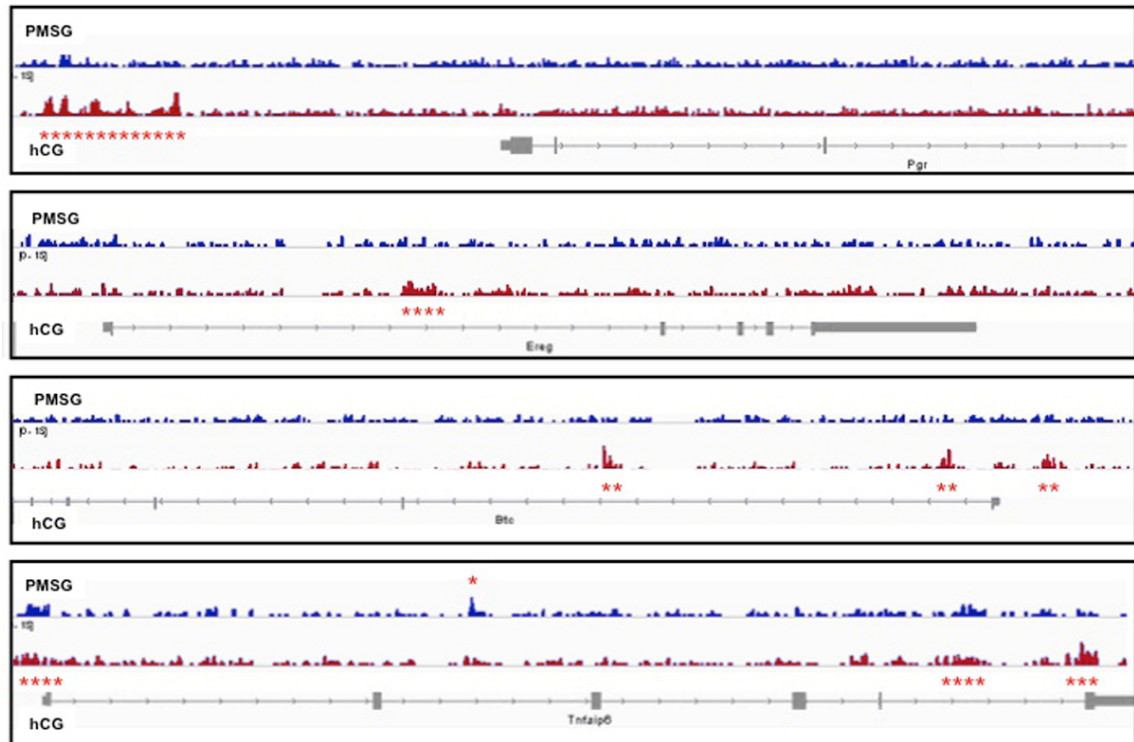


Figure 11) Profils FAIRE de gènes impliqués dans le processus ovulatoire (*Pgr*, *Ereg*, *Btc* et *Tnfrsf6*) dans les cellules de granulosa avant (PMSG, bleu) et après (hCG, rouge) le stimulus ovulatoire.

Les éléments de régulation statistiquement significatifs par rapport au bruit de fond, déterminés par l'outil de détection de signaux MACS, sont représentés par des astérisques rouges.

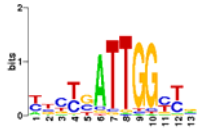
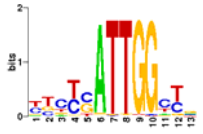

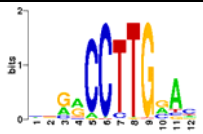
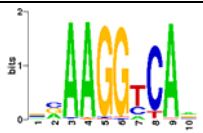
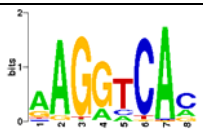
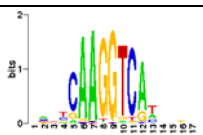
### 4. Analyse d'enrichissement de motifs

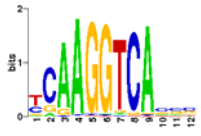
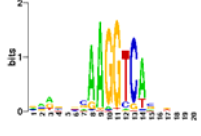
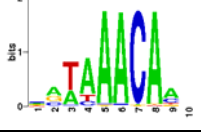
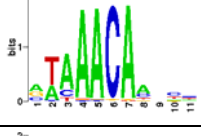
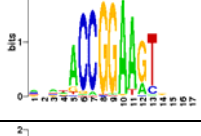
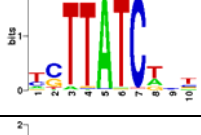
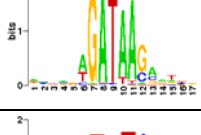
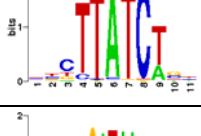
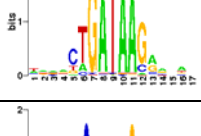
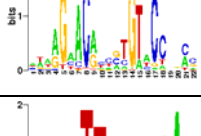
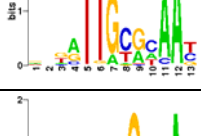
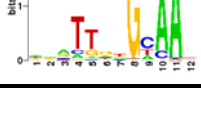
Comme les éléments de régulation sont des sites spécifiques d'interaction d'une multitude de facteurs de transcription, une analyse de motifs enrichis dans chacun des groupes a été performée en utilisant l'outil SeqPos sur Galaxy-cistrome. Cette étude a été entreprise dans le but de trouver des motifs enrichis de manière statistiquement significative dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire comparativement au bruit de fond (valeur  $p \leq 0.001$ ). La table 1 démontre quelques uns

des motifs enrichis dans les signaux FAIRE avant (PMSG) et après (HCG) le stimulus ovulatoire. Les valeurs p associées à ces motifs ainsi que le logo correspondant à chaque motif de liaison sont aussi présentés dans la table 1. Parmi les motifs, on retrouve le motif spécifique pour le récepteur nucléaire SF-1, membre de la famille des récepteurs nucléaires et indispensable pour l'axe de reproduction tant chez la femelle que le mâle<sup>87</sup>. D'autres motifs, ceux de LRH-1, NR4A1, NR4A2, FOXO4, FOXO1 ainsi que des membres de la famille GATA se retrouvent également dans la liste. Remarquablement, les motifs de C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  et RUNX1 apparaissent exclusivement suite au stimulus ovulatoire.

**Table 1) Liste de motifs démontrant un enrichissement statistiquement significatif et étant reconnus pour avoir un rôle dans la fonction ovarienne.**

Les valeurs p (échelle logarithmique) sont indiquées pour les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.

Motif	Nom	Valeur p PMSG -10xlog(pval)	Valeur p hCG -10xlog(pval)	Logo
EN0377	SREBF2	690.77	690.77	
EN0032	Pbx3	690.77	690.77	
M01132	SF-1	618.28	549.35	
M01142	LRH-1	227.66	121.74	
M01217	NR4A1	354.21	445.09	
MA0160	NR4A2	227.66	132.97	
UP00079	ESRRA	449.42	437.86	

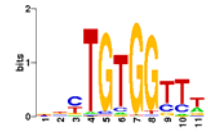
M01589	ESRRB	312.97	249.91	
M01248	NR0B1	219.92	175.57	
M00473	FOXO1	228.39	179.90	
M00472	FOXO4	263.5	143.35	
UP00013	GABPA	446.40	322.99	
M00348	GATA2	337.94	204.98	
UP00100	GATA6	256.11	97.40	
MA0035	GATA1	245.85	259.48	
UP00080	GATA5	131.41	167.69	
MA0007	AR	167.58	-	
MC0008	C/EBPa	-	140.92	
MC00013	C/EBPb	-	275.32	



---

MA0002	RUNX1	-	72.94
--------	-------	---	-------

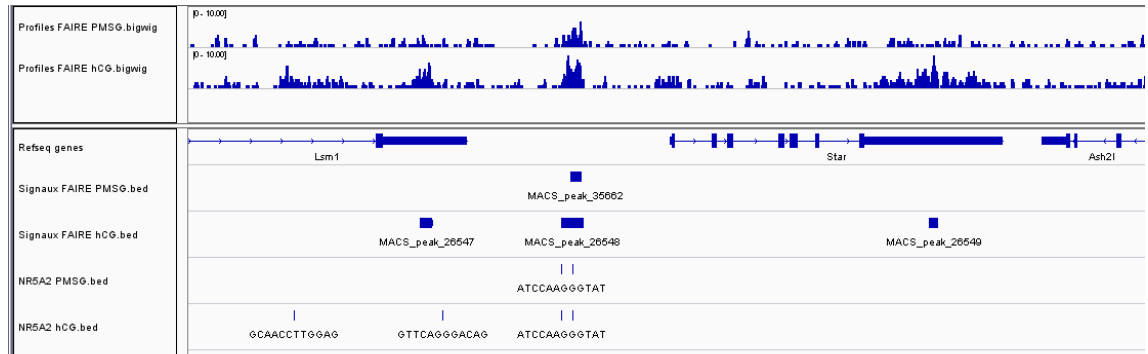
---



## 5. Analyse des sites de liaison des membres de la famille NR5A dans les cellules de granulosa

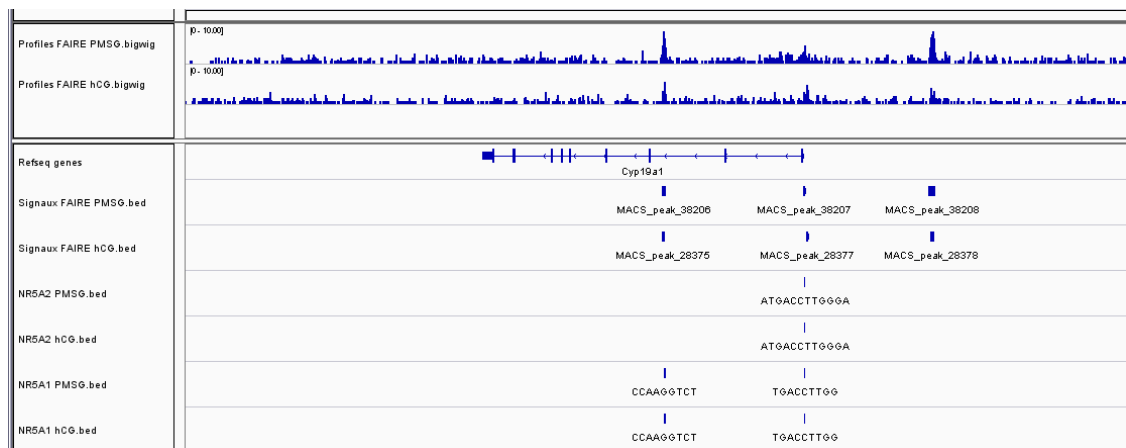
Les éléments de régulation étant des séquences riches en site de liaison de facteurs de transcription, une analyse des sites des membres de la famille des récepteurs nucléaires NR5A a été entreprise à l'échelle du génome. Cette étude a été entreprise afin d'apprécier le potentiel de prédiction *in silico* des sites de liaison de facteurs de transcription en utilisant la méthode FAIRE-seq. L'outil MISP, sur galaxy-cistrome, permet d'identifier les sites de liaison associés à des facteurs de transcription à travers l'ensemble des données générées par FAIRE-seq. Ce sont les sites de liaison des récepteurs NR5A1 et NR5A2, présents aux gènes *Star*, *cyp19a1* et *Inha* qui ont été analysés, dans le but de comparer les données déjà présentes dans la littérature aux résultats générés par les outils bioinformatiques. Des expériences de luciférase, d'electrophoretic mobility shift assay (EMSA) et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) effectués par d'autres chercheurs ont permis l'identification de séquences régulatrices et de sites de liaison des membres de la famille NR5A<sup>22; 67; 6; 99</sup> aux promoteurs de ces gènes, qui ont été comparés aux sites prédits par bioinformatique.

La figure 12 démontre les sites de liaison des facteurs NR5A1 et NR5A2 prédits par l'outil MISP au gène *Star*. De manière générale, aucun site de liaison n'est apparent au promoteur proximal du gène *Star*. En ce qui concerne les sites de liaison présents dans les cellules avant le stimulus ovulatoire (PMSG), deux sites pour NR5A2 sont retrouvés à environ -3000pb du promoteur proximal, alors qu'un seul site est identifié pour NR5A1.



**Figure 12) Sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Star* dans les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.**

La figure 13 présente les sites de liaison de NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Cyp19a1*. Pour les deux facteurs, des sites de liaison sont présents au promoteur proximal.



**Figure 13) Sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Cyp19a1* dans les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.**

Finalement, la figure 14 illustre les sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Inha*, sur lequel tous les sites sont présents au promoteur proximal. En ce qui concerne NR5A2, un seul site est présent au promoteur proximal, tant dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire. Cependant, deux sites de liaison sont apparents pour le facteur NR5A1 dans ces cellules.

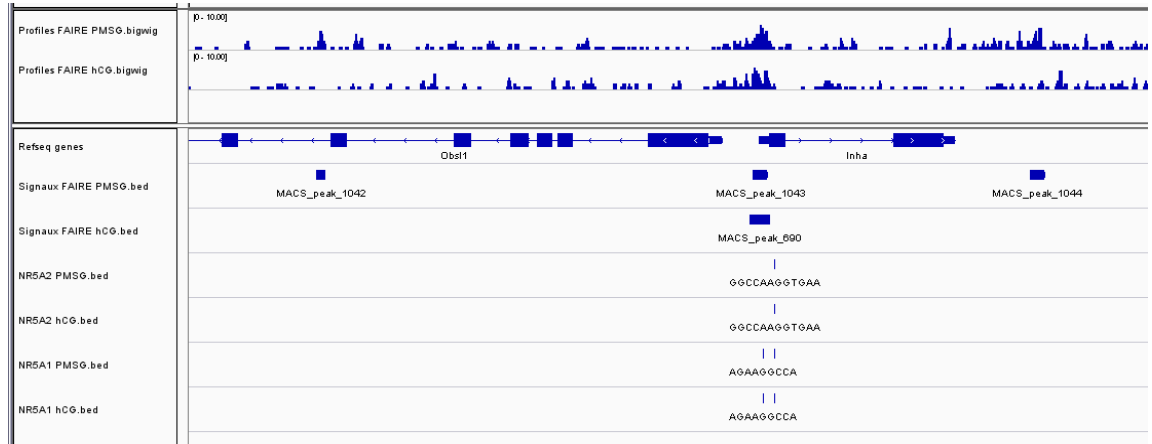


Figure 14) Sites de liaison des récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 au promoteur du gène *Inha* dans les cellules de granulosa avant (PMSG) et après (hCG) le stimulus ovulatoire.

## 6. Prédiction des sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$ et C/EBP $\beta$ dans les cellules de granulosa chez la souris

Comme le pouvoir de prédiction de sites de liaison de facteurs de transcription par la méthode FAIRE-seq semble adéquat, une prédiction des sites de liaison potentiels des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  aux promoteurs des gènes *Has2*, *Lepr* et *Runx2* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire a été entreprise. Les figures 15, 16 et 17 démontrent respectivement des sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  présents à ces gènes dans les cellules de granulosa après le stimulus ovulatoire. En ce qui concerne le gène *Has2*, deux sites de liaison pour le facteur C/EBP $\alpha$  sont apparents, soit un en amont du gène et l'autre dans un intron. Un seul site C/EBP $\beta$  est présent et corrèle avec le site C/EBP $\alpha$  au niveau de l'intron (Figure 15).

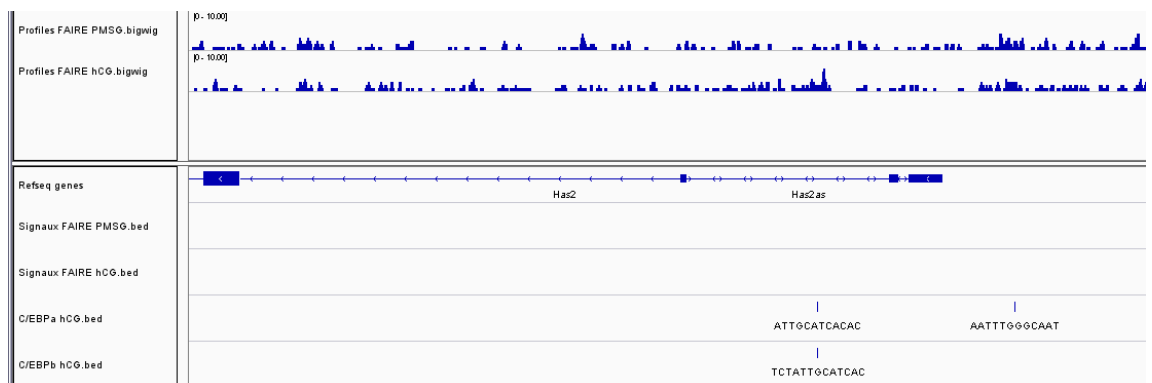


Figure 15) Sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sur le gène *Has2* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire.

Le gène *Lepr* porte également deux sites  $C/EBP\alpha$  et un seul site  $C/EBP\beta$ , mais ces sites se retrouvent tous dans une région distale située en amont du gène. Ces sites corrèlent également avec des signaux FAIRE statistiquement significatifs (Figure 16).

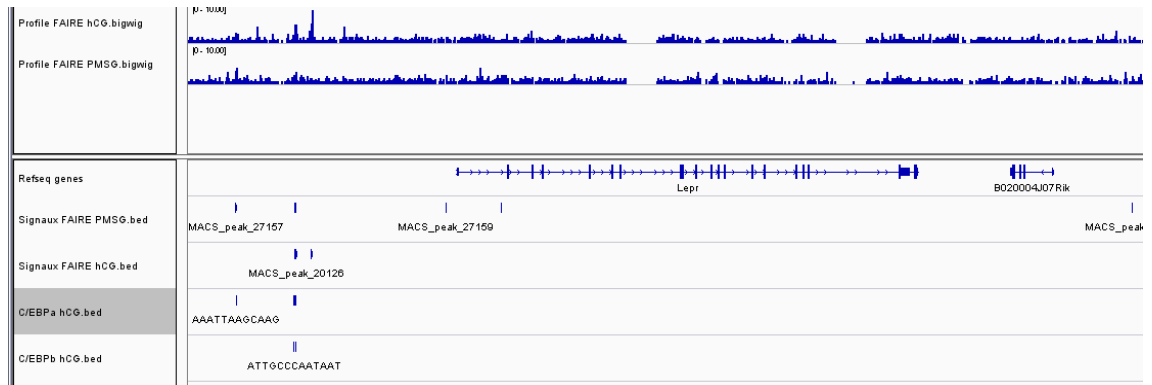


Figure 16) Sites de liaison des facteurs  $C/EBP\alpha$  et  $C/EBP\beta$  sur le gène *Lepr* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire

Le gène *Runx2* contient une multitude de sites  $C/EBP\alpha$  et  $C/EBP\beta$  se situant aux alentours de signaux FAIRE statistiquement significatifs dans des introns (Figure 17).

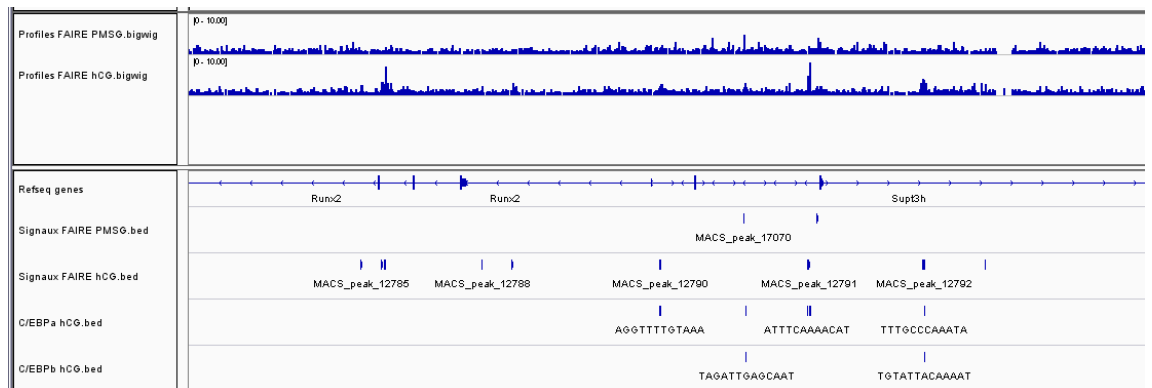


Figure 17) Sites de liaison des facteurs  $C/EBP\alpha$  et  $C/EBP\beta$  sur le gène *Runx2* dans les cellules de granulosa suivant le stimulus ovulatoire.

## Discussion

### 1. Les cellules de granulosa subissent une reprogrammation radicale suite au pic de LH

En utilisant la méthode FAIRE-seq, cette étude a permis d'identifier pour la première fois, à l'échelle du génome, les éléments de régulation induits par le pic de LH, dans les cellules de granulosa chez la souris. Les régions variant entre les cellules de granulosa avant (groupe PMSG) et après (groupe hCG) le stimulus ovulatoire présente certainement des éléments clés, jouant un rôle fondamental dans le processus biologique de différenciation cellulaire induit par le pic de LH.

Des variations entre le groupe PMSG et hCG ont effectivement été observées en comparant les échantillons de FAIRE-seq. De façon globale, une quantité importante de signaux FAIRE spécifiques aux cellules de granulosa avant le stimulus ovulatoire (30576) s'éteignent pour faire place à de nouveaux signaux suite au stimulus ovulatoire (19259), modifiant de manière radicale le profil FAIRE des cellules de granulosa. Cette modification drastique est aussi reflétée dans l'analyse ontologique effectuée sur les signaux FAIRE des groupes PMSG et hCG. À partir de cellules spécialisées dans le métabolisme et le transport accru du cholestérol et des lipides, les cellules de granulosa se sont transformées complètement suite au stimulus ovulatoire. Effectivement, 4h suivant le stimulus ovulatoire, ce sont des processus reliés, entre autre, au développement placentaire, à la voie TGF $\beta$ , aux processus embryonnaires impliqués dans la gestation, à la différenciation des cellules adipeuses et la régulation de la biosynthèse hormonale qui prennent place. Malgré que la plupart de ces processus biologiques ne soient pas directement reliés à l'ovaire, ce sont plutôt les gènes présents dans ces grandes catégories qui sont informatifs. Par exemple, dans la catégorie du développement placentaire se retrouvent plusieurs facteurs, tels que EGFr<sup>105</sup>, C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ <sup>42</sup>, ainsi que les membres de la famille GATA<sup>10</sup>, qui sont des facteurs reconnus pour être indispensables au fonctionnement à l'ovulation. L'analyse ontologique a été utilisée d'avantage pour illustrer le potentiel de reprogrammation global du pic de LH dans les cellules de granulosa. Par contre, ces données pourraient être exploitées

d'avantage afin de caractériser plus précisément les gènes impliqués dans la reprogrammation biologique des cellules de granulosa induite par le stimulus ovulatoire chez la souris.

## **2. Distribution des signaux FAIRE dans les régions spécialisées de la chromatine**

De manière consistante avec des données déjà présentes dans la littérature, seulement 22.7% (PMSG) et 20.2% des signaux FAIRE sont retrouvés à  $\leq 1000$ pb d'un TSS connu. La majorité des régions régulatrices identifiées par FAIRE se retrouvent dans des régions distales intergéniques (34.6% PMSG; 36.2% hCG) ou dans des introns (31.2% PMSG; 34.7% hCG)<sup>135</sup>. Cette étude, réalisée par Waki *et al*, a démontré que les régions identifiées par FAIRE, situées à l'extérieur des régions promotrices, sont corrélées avec une signature chromatiniennne typique des enhanceurs. Cette étude s'est intéressée aux signaux FAIRE impliqués dans le processus de différenciation cellulaire des cellules adipeuses, passant de préadipocytes à adipocytes. L'étude a mis en évidence le fait que les signaux FAIRE associés aux promoteurs variaient peu entre ces types cellulaires, contrairement aux signaux associés avec des régions distales qui démontraient des changements dynamiques entre les deux états de différenciation, impliquant le rôle de ces éléments dans la régulation transcriptionnelle cellule spécifique.

En regardant les résultats obtenus par la méthode FAIRE-seq dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire, il est possible d'observer que la majorité des signaux FAIRE, présents aux groupes de gènes liés au métabolisme et au transport du cholestérol, de même qu'à la stéroïdogénèse et à l'ovulation, se situent dans des régions intergéniques ou dans des introns. Remarquablement, les gènes *Pgr*, *Ereg*, *Btc* et *Tnfrsf10b*, qui sont tous essentiels à l'ovulation et induits par l'administration de hCG, possèdent des signaux FAIRE situés dans des régions distales ou dans des introns, suggérant que ces éléments contrôlent la régulation transcriptionnelle cellule spécifique hormono-dépendante.

### 3. Analyse de motifs enrichis par FAIRE-seq

La méthode d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage (ChIP-seq) est largement utilisée pour découvrir le motif précis de liaison d'un facteur de transcription donné, ainsi que pour découvrir les cibles transcriptionnelles de celui-ci. La valeur de ces données repose entièrement sur la qualité de l'immunoprécipitation, qui est dépendante de la disponibilité et de l'efficacité d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. De plus, les régions précipitées sont limitées aux sites de liaison du facteur de transcription étudié. À l'opposé, la combinaison de l'analyse de motifs et d'éléments de régulation enrichis par FAIRE-seq ne nécessite pas d'anticorps et génère un balayage global des sites de liaison de facteurs de transcription essentiels pour un type cellulaire d'intérêt, générant ainsi un immense potentiel informatif.

Cette approche a été d'abord utilisée dans le but d'identifier les motifs présents à travers l'ensemble des signaux FAIRE des cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire. Un grand nombre de motifs ont été identifiés dans les deux groupes, dont les motifs de plusieurs facteurs déjà reconnus pour être indispensables pour la fonction ovarienne, tels que les membres de la famille des récepteurs nucléaires NR5A<sup>37; 106</sup>, les facteurs GATA<sup>10</sup> et FOXO<sup>23</sup>. Le motif du récepteur aux androgènes (AR), un récepteur nucléaire exprimé dans les follicules en croissance et impliqué dans la folliculogénèse et la croissance folliculaire apparaît de manière spécifique dans les cellules du groupe PMSG<sup>132</sup>. Certains motifs, ceux des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ <sup>126</sup>, de même que RUNX1<sup>79</sup>, qui sont des facteurs induits par le pic de LH dans les cellules de granulosa, apparaissent exclusivement dans les cellules du groupe hCG, ce qui permet d'apprécier la valeur du potentiel de prédiction des motifs de facteurs de transcription générés par la méthode FAIRE-seq.

#### 4. Prédiction de sites de liaison de facteurs de transcription : Analyse des site de liaison des membre de la famille NR5A

Bien que les récepteurs nucléaires NR5A1 et NR5A2 soit dérivés de deux gènes différents, ils partagent un haut degré d'homologie, particulièrement au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, LRH-1 et SF-1 sont connus pour lier les mêmes séquences d'ADN dans le génome et des études ont démontré que des gènes exprimés dans l'ovaire préalablement identifiés comme cibles de NR5A1 peuvent également être activés par NR5A2<sup>136; 28; 123</sup>. Plusieurs études de caractérisation de promoteurs *in vitro* ont été effectuées afin de repérer les sites de liaison de ces facteurs, ainsi que leur rôle dans l'expression de ces gènes. Dans le but de comparer les données présentes dans la littérature aux résultats générés par les outils bioinformatiques les sites de liaison des récepteurs NR5A1 et NR5A2, présents aux gènes *Star*, *Cyp19a1* et *Inha* ont été analysés.

En ce qui concerne le gène *Star*, des études d'analyse de la région 5' ont été entreprises dans le but d'élucider les mécanismes de régulation de son expression cellule spécifique et hormono-dépendante dans les lignées cellulaires surrénales Y-1 et de Leydig MA-10<sup>22</sup>. Ces études, en utilisant un protocole de transfection transitoire utilisant le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de la région 5' du gène *Star*, ont permis de caractériser deux sites de liaison de NR5A1 essentiels pour l'expression de base, mais non requis pour l'induction hormonale du gène *Star*, situés à -42pb et -135pb par rapport au site de départ de la transcription (TSS). Plus récemment, Mizutani *et al*<sup>99</sup> ont démontré, en utilisant des cellules souches mésenchymales (MSC), que l'expression du gène *Star* est également régulée par une région de contrôle distale. En utilisant l'electrophoretic mobility shift assay (EMSA) et l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), un nouveau site de liaison NR5A1 a été identifié, situé entre 3000 et 3400pb en amont du gène *Star*. Un essai de gène rapporteur luciférase a révélé que cette région est un régulateur puissant de la transcription du gène *Star* dans les MSC, mais également dans la lignée KGN, une lignée de cellules de granulosa tumorales. Des analyses de ChIP sur l'histone H3 ont démontré que suite à l'expression de NR5A1, une éviction des nucléosome prend place à ce site dans ces deux contextes cellulaires. Curieusement, dans la lignée cellulaire KGN, l'élément de régulation distal semble être beaucoup plus



important que le promoteur proximal dans régulation de l'activité transcriptionnelle. Le fragment associé à ce dernier ne semble pas avoir le potentiel d'induire l'expression de la luciférase dans ces cellules. Effectivement, selon les résultats obtenus par FAIRE-seq dans les cellules de granulosa chez la souris, l'élément de régulation situé entre 3000 et 3400pb est associé à un signal FAIRE significatif ainsi qu'à un site de liaison pour NR5A1. À l'inverse, la région promotrice du gène *Star* est dépourvue de ces éléments de régulation, suggérant que l'élément distal est celui qui dirige la transcription du gène *Star* dans les cellules de granulosa chez la souris. En plus du site de liaison pour NR5A1, deux sites de liaison pour NR5A2 apparaissent à cet élément de régulation, suggérant que NR5A2 régule directement l'expression du gène *Star* également. Cependant, aucune étude de la liaison de NR5A2 au promoteur du gène *Star* n'a été effectuée à ce jour.

Pour le gène *Cyp19a1*, seulement le promoteur proximal a été caractérisé pour sa liaison aux facteurs NR5A1 et NR5A2. Des analyses de EMSA sur des extraits nucléaires de cellules de granulosa primaires de lapin ont permis de démontrer que ces cellules expriment les facteurs NR5A1 et NR5A2 et que ces derniers ont la capacité de se lier *in vitro* à la région située entre -133pb et -126pb par rapport au TSS du promoteur PII du gène *Cyp19a1*, région correspondant ainsi au site NREA<sup>6</sup>. Les résultats de FAIRE-seq démontrent effectivement des sites de liaison pour ces deux facteurs au promoteur proximal du gène *Cyp19a1*. Un élément de régulation beaucoup plus intense que celui situé au promoteur proximal est présent dans la séquence codante du gène et est corrélé à un site de liaison spécifique à NR5A1. Aucune donnée à propos de cet élément de régulation n'est disponible dans la littérature.

Quand au gène *Inha*, des études de déplétion et de mutagenèse dirigée ont localisé un site de liaison de NR5A1 au promoteur, situé entre -137pb et -129pb par rapport au TSS. Des mutations de ce site éliminent complètement l'activation du promoteur du gène *Inha*<sup>67</sup>. Plus récemment, des études de transfection utilisant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *Inha* dans la lignée de cellules de granulosa GRMO2 a démontré que non seulement NR5A1, mais également NR5A2 peuvent induire l'activité de ce promoteur<sup>139</sup>. Des expériences de ChIP ont cependant démontré une différence d'association de NR5A1 et NR5A2 avec le promoteur du gène *Inha*, tant dans des

cellules de granulosa primaires que dans la lignée GRMO2. En effet, ces études démontrent que NR5A2 remplace NR5A1 suite à une stimulation hormonale, suggérant que ces facteurs ont des fonctions distinctes dans la régulation hormonale du gène *Inha*. En ce qui concerne les résultats obtenus par FAIRE-seq au promoteur du gène *Inha*, des sites spécifiques pour NR5A1 et NR5A2 sont effectivement présents au promoteur proximal.

Ces données permettent donc d'apprécier le potentiel de prédiction *in silico* des sites de liaison de facteurs de transcription en utilisant la méthode FAIRE-seq, suggérant qu'il est possible de prédire avec précision des sites présents dans le génome d'un type cellulaire donné en utilisant la méthode FAIRE-seq.

## 5. Identification de sites de liaison pour les facteurs C/EBP $\alpha$ et C/EBP $\beta$

Dans leur étude utilisant une déplétion conditionnelle double de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  dans les cellules de granulosa chez la souris, Fan *et al* ont récemment démontré le rôle essentiel de ces facteurs pour les processus d'ovulation, de lutéinisation et de vascularisation dans les cellules de granulosa chez la souris<sup>42</sup>. En mettant cette conclusion en lien avec l'apparition des motifs de ces facteurs spécifiquement dans les cellules de granulosa après le stimulus ovulatoire, il est possible d'apprécier le pouvoir de prédiction des motifs de facteurs de transcription générés par la méthode FAIRE-seq. Dans cette étude, un profil de l'expression des gènes affectés par la déplétion de ces facteurs a permis d'identifier plusieurs cibles potentielles de C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ , 4h suivant l'administration de hCG. Dans cette liste se retrouve le gène *Has2*, qui est reconnu pour être essentiel à la formation de la matrice extracellulaire durant le processus d'expansion du cumulus<sup>50</sup>. Cette liste inclut également des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (*Lepr*, *Igfbp3*, *Irs2*) et le facteur de transcription *Runx2*<sup>104</sup>, qui est exprimé dans les follicules ovulatoires. En utilisant les données générées par FAIRE-seq pour retrouver les sites de liaison des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  dans le génome, les gènes *Has2*, *Lepr* et *Runx2* ont effectivement été associés avec des sites de liaison de ces facteurs, contrairement aux gènes *Igfbp3* et *Irs2*. Ceci suggère que *Has2*, *Lepr* et *Runx2* sont des cibles directes des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  dans les cellules

de granulosa chez la souris. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine permettraient de confirmer cette hypothèse et pourraient être entreprises afin de confirmer d'autres cibles potentielles de ces facteurs identifiées par FAIRE-seq.

## 6. RUNX1

Le motif pour le facteur de transcription RUNX1 apparaît de manière spécifique après le stimulus ovulatoire, au même titre que les motifs des facteurs C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$ , qui ont été démontré pour être essentiel à la fonction ovarienne. Peu d'informations sont actuellement disponibles à propos du rôle de ce facteur de transcription dans l'ovaire. L'expression de l'ARNm codant pour *Runx1* est induite de manière transitoire dans les follicules préovulatoires après la stimulation avec le hCG chez le rat<sup>73</sup>, suggérant que ce facteur est un modulateur transcriptionnel ayant un rôle important dans les événements induits par le pic de LH. Des expériences de déplétion de l'ARNm de *Runx1* par ARN interférents dans les cellules de granulosa primaires de rat conduisent à une diminution de la sécrétion de progestérone et à une réduction de l'ARNm des gènes *Cyp11a1*, *Hapl1*, *Mtl1* et *Rgc32*<sup>72</sup>. De plus, des expériences de EMSA ont identifié des sites de liaison fonctionnels de RUNX1 au promoteur du gène *Ptgs2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2) dans les cellules de granulosa primaires de rat, un gène reconnu pour être essentiel pour l'ovulation<sup>79</sup>. Toutes ces données suggèrent un rôle fondamental de RUNX1 dans le processus ovulatoire. En utilisant les données générées par FAIRE-seq concernant le facteur RUNX1, il serait possible de mieux caractériser son rôle dans la fonction ovarienne, afin d'établir un pont entre des phénomènes prédits *in silico* et leur implication réelle au point de vue physiologique.

## Conclusion

Pour conclure, seulement une petite fraction des données générés par la méthode FAIRE-seq dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire a été exploitée jusqu'à maintenant, mais ce premier pas a permis de démontrer l'immensité du potentiel informatif généré par cette technique. Cette étude a permis de démontrer que le pic de LH induit des modifications de la structure chromatinienne dans les cellules de

granulosa, se reflétant par une reprogrammation majeure des éléments de régulation, le tout étant corrélé avec une modification radicale des fonctions biologiques dans ces cellules. De plus, grâce à la méthode FAIRE-seq, il a été possible d'identifier plusieurs régulateurs transcriptionnels essentiels à la fonction ovarienne ainsi que leurs sites de liaison dans le génome chez la souris, suggérant que la méthode FAIRE-seq permet de prédire des événements moléculaires précis, ayant un sens physiologique réel.

La prochaine étape du projet sera de corrélérer les signaux FAIRE retrouvés dans les cellules de granulosa avant et après le stimulus ovulatoire avec le profil transcriptionnel des gènes en utilisant la technique RNA-seq. De plus, maintenant qu'une analyse approfondie des régions régulatrices présentes avant et après le pic de LH ont été identifiés chez la souris de type sauvage, une analyse comparative des régions régulatrices affectées chez les souris *Cebpa/b*<sup>-/-</sup> ou *LRH-1*<sup>-/-</sup> permettra certainement d'en apprendre d'avantage sur le fonctionnement de ces facteurs de transcription dans l'ovaire chez la souris. Il serait aussi possible de vérifier si les sites de liaison prédits pour les régulateurs transcriptionnels sont des sites réels de liaison, en comparant les résultats obtenus avec les résultats issus de données de ChIP-seq.

## Bibliographie

1. Abel MH, Wootton AN, Wilkins V *et al.* (2000) The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* **141**, 1795-1803.
2. Adam M, Robert F, Larochelle M *et al.* (2001) H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* **21**, 6270-6279.
3. Ahmad K & Henikoff S (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**, 1191-1200.
4. Alberts B JA, Lewis J, *et al.* (2002) The Structure and Function of DNA. In *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition ed., [G Science, editor]. New-York.
5. Allfrey VG, Faulkner R & Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786-794.
6. Andrieu T, Pezzi V, Sirianni R *et al.* (2009) cAMP-dependent regulation of CYP19 gene in rabbit preovulatory granulosa cells and corpus luteum. *J Steroid Biochem Mol Biol* **116**, 110-117.
7. Annunziato AT (2008) DNA packaging: Nucleosomes and chromatin. *Scitable*.
8. Barski A, Cuddapah S, Cui K *et al.* (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837.
9. Bell O, Tiwari VK, Thoma NH *et al.* (2011) Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet* **12**, 554-564.
10. Bennett J, Wu YG, Gossen J *et al.* (2012) Loss of GATA-6 and GATA-4 in granulosa cells blocks folliculogenesis, ovulation, and follicle stimulating hormone receptor expression leading to female infertility. *Endocrinology* **153**, 2474-2485.
11. Bernstein BE, Meissner A & Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-681.
12. Binelli M & Murphy BD (2010) Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod Fertil Dev* **22**, 1-12.
13. Blackwood EM & Kadonaga JT (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* **281**, 60-63.
14. Boerboom D, Pilon N, Behdjani R *et al.* (2000) Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process. *Endocrinology* **141**, 4647-4656.
15. Bowman GD (2010) Mechanisms of ATP-dependent nucleosome sliding. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 73-81.
16. Boyle AP, Song L, Lee BK *et al.* (2011) High-resolution genome-wide in vivo footprinting of diverse transcription factors in human cells. *Genome Res* **21**, 456-464.
17. Braunschweig U, Hogan GJ, Pagie L *et al.* (2009) Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. *EMBO J* **28**, 3635-3645.
18. Bryne JC, Valen E, Tang MH *et al.* (2008) JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update. *Nucleic Acids Res* **36**, D102-106.

19. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ *et al.* (1990) FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* **138**, 16-25.
20. Cairns BR (2009) The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**, 193-198.
21. Carletti MZ & Christenson LK (2009) Rapid effects of LH on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reproduction* **137**, 843-855.
22. Caron KM, Ikeda Y, Soo SC *et al.* (1997) Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* **11**, 138-147.
23. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R *et al.* (2003) Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* **301**, 215-218.
24. Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM *et al.* (1977) Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* **269**, 338-340.
25. Choi JH, Choi KC, Auersperg N *et al.* (2005) Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr Relat Cancer* **12**, 407-421.
26. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S *et al.* (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* **137**, 1447-1456.
27. Clapier CR & Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**, 273-304.
28. Clyne CD, Speed CJ, Zhou J *et al.* (2002) Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem* **277**, 20591-20597.
29. Cunningham FJ (1962) Induction of ovulation in immature mice as an assay of gonadotrophin. *J Endocrinol* **24**, 215-221.
30. Curry TE, Jr. & Osteen KG (2003) The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* **24**, 428-465.
31. Curry TE, Jr., Song L & Wheeler SE (2001) Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. *Biol Reprod* **65**, 855-865.
32. Das S, Maizels ET, DeManno D *et al.* (1996) A stimulatory role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in follicle-stimulating hormone-activated mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **137**, 967-974.
33. Davis JS, Weakland LL, West LA *et al.* (1986) Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* **238**, 597-604.
34. Devoto L, Fuentes A, Kohen P *et al.* (2009) The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertil Steril* **92**, 1067-1079.
35. Diaz FJ, Wigglesworth K & Eppig JJ (2007) Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* **120**, 1330-1340.
36. Dierich A, Sairam MR, Monaco L *et al.* (1998) Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13612-13617.

37. Duggavathi R, Volle DH, Matakı C *et al.* (2008) Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev* **22**, 1871-1876.
38. Edson MA, Nagaraja AK & Matzuk MM (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* **30**, 624-712.
39. Elvin JA, Clark AT, Wang P *et al.* (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* **13**, 1035-1048.
40. Ernst J & Kellis M (2010) Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol* **28**, 817-825.
41. Espey LL & JSR (2006) *Physiology of reproduction* Knobil and Neill's.
42. Fan HY, Liu Z, Johnson PF *et al.* (2011) CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)-alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol* **25**, 253-268.
43. Fan HY, Liu Z, Shimada M *et al.* (2009) MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* **324**, 938-941.
44. Fan HY, Shimada M, Liu Z *et al.* (2008) Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development* **135**, 2127-2137.
45. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A *et al.* (2003) H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**, 497-508.
46. Field Y, Kaplan N, Fondufe-Mittendorf Y *et al.* (2008) Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000216.
47. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA *et al.* (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**, 1870-1881.
48. Flaus A & Owen-Hughes T (2011) Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: the means to the end. *FEBS J* **278**, 3579-3595.
49. Floer M, Wang X, Prabhu V *et al.* (2010) A RSC/nucleosome complex determines chromatin architecture and facilitates activator binding. *Cell* **141**, 407-418.
50. Fulop C, Salustri A & Hascall VC (1997) Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. *Arch Biochem Biophys* **337**, 261-266.
51. Gaulton KJ, Nammo T, Pasquali L *et al.* (2010) A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat Genet* **42**, 255-259.
52. Gevry N, Chan HM, Laflamme L *et al.* (2007) p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* **21**, 1869-1881.
53. Gevry N, Hardy S, Jacques PE *et al.* (2009) Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* **23**, 1522-1533.
54. Giresi PG, Kim J, McDaniell RM *et al.* (2007) FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res* **17**, 877-885.
55. Giresi PG & Lieb JD (2009) Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). *Methods* **48**, 233-239.
56. Gonzalez-Robayna IJ, Alliston TN, Buse P *et al.* (1999) Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol* **13**, 1318-1337.

57. Goodwin B, Jones SA, Price RR *et al.* (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* **6**, 517-526.
58. Grimm SL & Rosen JM (2003) The role of C/EBPbeta in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 191-204.
59. Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
60. Hahn S (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 394-403.
61. He HH, Meyer CA, Shin H *et al.* (2010) Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nat Genet* **42**, 343-347.
62. Henikoff S (2008) Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* **9**, 15-26.
63. Henikoff S, Furuyama T & Ahmad K (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* **20**, 320-326.
64. Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M *et al.* (2006) Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol* **20**, 1300-1321.
65. Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* **124**, 43-101.
66. Irving-Rodgers HF & Rodgers RJ (2005) Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. *Cell Tissue Res* **322**, 89-98.
67. Ito M, Park Y, Weck J *et al.* (2000) Synergistic activation of the inhibin alpha-promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol* **14**, 66-81.
68. Jenuwein T & Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
69. Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP *et al.* (2004) Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* **18**, 1610-1619.
70. Jin C & Felsenfeld G (2007) Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* **21**, 1519-1529.
71. Jin J, Cai Y, Li B *et al.* (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* **30**, 680-687.
72. Jo M & Curry TE, Jr. (2006) Luteinizing hormone-induced RUNX1 regulates the expression of genes in granulosa cells of rat periovulatory follicles. *Mol Endocrinol* **20**, 2156-2172.
73. Jo M, Gieske MC, Payne CE *et al.* (2004) Development and application of a rat ovarian gene expression database. *Endocrinology* **145**, 5384-5396.
74. Kumar TR, Wang Y, Lu N *et al.* (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* **15**, 201-204.
75. Lei ZM, Mishra S, Zou W *et al.* (2001) Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* **15**, 184-200.
76. Li G & Reinberg D (2011) Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 175-186.
77. Li H & Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589-595.



78. Li X, Kim JW, Gronborg M *et al.* (2007) Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBPbeta during adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11597-11602.
79. Liu J, Park ES & Jo M (2009) Runt-related transcription factor 1 regulates luteinized hormone-induced prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression in rat periovulatory granulosa cells. *Endocrinology* **150**, 3291-3300.
80. Liu T, Ortiz JA, Taing L *et al.* (2011) Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biol* **12**, R83.
81. Liu XS, Brutlag DL & Liu JS (2002) An algorithm for finding protein-DNA binding sites with applications to chromatin-immunoprecipitation microarray experiments. *Nat Biotechnol* **20**, 835-839.
82. Liu YX & Hsueh AJ (1986) Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. *Biol Reprod* **35**, 27-36.
83. Lorch Y, Maier-Davis B & Kornberg RD (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3090-3093.
84. Lu C, Zhu F, Cho YY *et al.* (2006) Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell* **23**, 121-132.
85. Luck MR & Zhao Y (1993) Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. *J Reprod Fertil* **99**, 647-652.
86. Luger K, Mader AW, Richmond RK *et al.* (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
87. Luo X, Ikeda Y & Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**, 481-490.
88. Ma J (2011) Transcriptional activators and activation mechanisms. *Protein Cell* **2**, 879-888.
89. Magoffin DA (2005) Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1344-1349.
90. Maizels ET, Mukherjee A, Sathanandam G *et al.* (2001) Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol* **15**, 716-733.
91. Malik HS & Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**, 882-891.
92. Mantena SR, Kannan A, Cheon YP *et al.* (2006) C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1870-1875.
93. Margueron R, Trojer P & Reinberg D (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**, 163-176.
94. Marsh JM (1976) The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biol Reprod* **14**, 30-53.
95. McGee EA & Hsueh AJ (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* **21**, 200-214.
96. McLean CY, Bristor D, Hiller M *et al.* (2010) GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* **28**, 495-501.
97. Metivier R, Reid G & Gannon F (2006) Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep* **7**, 161-167.
98. Misrahi M, Beau I, Meduri G *et al.* (1998) Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12**, 35-66.

99. Mizutani T, Yazawa T, Ju Y *et al.* (2010) Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J Biol Chem* **285**, 28240-28251.
100. Mukherjee A, Park-Sarge OK & Mayo KE (1996) Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **137**, 3234-3245.
101. Murphy BD (2000) Models of luteinization. *Biol Reprod* **63**, 2-11.
102. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T *et al.* (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2207-2211.
103. Nechaev S & Adelman K (2011) Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta* **1809**, 34-45.
104. Park ES, Park J, Franceschi RT *et al.* (2012) The role for runt related transcription factor 2 (RUNX2) as a transcriptional repressor in luteinizing granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*.
105. Park JY, Su YQ, Ariga M *et al.* (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* **303**, 682-684.
106. Pelusi C, Ikeda Y, Zubair M *et al.* (2008) Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* **79**, 1074-1083.
107. Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS *et al.* (1991) Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* **129**, 3200-3207.
108. Phillips TS, K (2008) Chromatin remodeling in eukaryotes. *Scitable*.
109. Pierce B (2005) *Genetics: A Conceptual Approach*. 2nd ed ed. New York: W. H. Freeman and Company.
110. Piontekowitz Y, Enerback S & Hedin L (1993) Expression and hormonal regulation of the CCAAT enhancer binding protein-alpha during differentiation of rat ovarian follicles. *Endocrinology* **133**, 2327-2333.
111. Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D *et al.* (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**, 434-438.
112. Ramathal C, Bagchi IC & Bagchi MK (2010) Lack of CCAAT enhancer binding protein beta (C/EBPbeta) in uterine epithelial cells impairs estrogen-induced DNA replication, induces DNA damage response pathways, and promotes apoptosis. *Mol Cell Biol* **30**, 1607-1619.
113. Redon C, Pilch D, Rogakou E *et al.* (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 162-169.
114. Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* **15**, 725-751.
115. Richards JS (2005) Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* **234**, 75-79.
116. Richards JS & Pangas SA (2010) The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* **120**, 963-972.
117. Richards JS, Russell DL, Ochsner S *et al.* (2002) Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* **64**, 69-92.

118. Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA *et al.* (2006) EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6506-6511.
119. Rodrigue S, Materna AC, Timberlake SC *et al.* (2010) Unlocking short read sequencing for metagenomics. *PLoS One* **5**, e11840.
120. Russell DL & Robker RL (2007) Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* **13**, 289-312.
121. Saha A, Wittmeyer J & Cairns BR (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 437-447.
122. Seger R, Hanoch T, Rosenberg R *et al.* (2001) The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* **276**, 13957-13964.
123. Sirianni R, Seely JB, Attia G *et al.* (2002) Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Endocrinol* **174**, R13-17.
124. Sirois J & Richards JS (1993) Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem* **268**, 21931-21938.
125. Song L & Crawford GE (2010) DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb Protoc* **2010**, pdb prot5384.
126. Sterneck E JP (2000) Expression and Function of CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs) in the Ovary. In *Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts*, pp. 277-291 [e Adashi e., editor]: Springer-Verlag new York Inc.
127. Sterneck E, Tessarollo L & Johnson PF (1997) An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* **11**, 2153-2162.
128. Stocco C, Telleria C & Gibori G (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* **28**, 117-149.
129. Strahl BD & Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
130. Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**, 599-606.
131. Suto RK, Clarkson MJ, Tremethick DJ *et al.* (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* **7**, 1121-1124.
132. Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ *et al.* (1995) Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol* **145**, 535-543.
133. Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845.
134. Van Holde KE, Sahasrabudde CG & Shaw BR (1974) A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Res* **1**, 1579-1586.
135. Waki H, Nakamura M, Yamauchi T *et al.* (2011) Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* **7**, e1002311.
136. Wang ZN, Bassett M & Rainey WE (2001) Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 beta-hydroxylase. *J Mol Endocrinol* **27**, 255-258.
137. Watson JD & Crick FH (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **18**, 123-131.

138. Weake VM & Workman JL (2010) Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet* **11**, 426-437.
139. Weck J & Mayo KE (2006) Switching of NR5A proteins associated with the inhibin alpha-subunit gene promoter after activation of the gene in granulosa cells. *Mol Endocrinol* **20**, 1090-1103.
140. Williams SC, Angerer ND & Johnson PF (1997) C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr* **6**, 371-385.
141. Wingender E, Chen X, Hehl R *et al.* (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**, 316-319.
142. Xie Z, Hu S, Blackshaw S *et al.* (2010) hPDI: a database of experimental human protein-DNA interactions. *Bioinformatics* **26**, 287-289.
143. Yuan GC, Liu YJ, Dion MF *et al.* (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**, 626-630.
144. Zhang Y, Liu T, Meyer CA *et al.* (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137.
145. Zhu C, Byers KJ, McCord RP *et al.* (2009) High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res* **19**, 556-566.

