

Université de Montréal

Rôle des facteurs de transcription Tpit et NeuroD1
dans l'activation histospécifique de la POMC et
dans la différenciation des cellules corticotropes

Par
Bruno Lamolet

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Ph.D. en biologie moléculaire

Juin 2004



©, Bruno Lamolet, 2004

QH

506

U54

2005

V.001

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle des facteurs de transcription Tpit et NeuroD1
dans l'activation histospécifique de la POMC et
dans la différenciation des cellules corticotropes

Présentée par :

Bruno Lamolet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry
présidente-rapporteure

Jacques Drouin
directeur de recherche

Jean Vacher
membre du jury

Vincent Giguère
examineur externe

Fernand A. Roberge
représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'expression du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) dans les cellules corticotropes constitue le marqueur de différenciation terminale le plus précoce dans l'hypophyse. Il a été montré que la transcription histo-spécifique du gène de la POMC dépendait au moins en partie de l'interaction synergique entre le facteur pan-hypophysaire à boîte homéo Pitx1 et un dimère de facteurs bHLH contenant NeuroD1 et Pan1 qui est ubiquitaire. Toutefois, ces facteurs ne sont pas suffisants pour la régulation histo-spécifique de la POMC.

Les études du mécanisme de la transcription du gène de la POMC m'ont amené à cloner un nouveau facteur de transcription à boîte T, Tpit, qui interagit avec Pitx1. Tpit est exprimé uniquement dans les lignées de l'hypophyse qui expriment la POMC, soit les corticotropes et les mélanotropes, et pas ailleurs dans l'organisme même dans les neurones exprimant la POMC. Chez la souris, l'expression de Tpit précède de peu celle de la POMC à e12,5 dans les corticotropes. Elle apparaît ensuite dans les mélanotropes et continue chez l'adulte. De plus, des expériences de gain et de perte de fonction ont montré que Tpit était absolument requis pour la différenciation de ces lignées, mais cependant pas pour leur détermination.

Dans l'hypophyse, NeuroD1 est exprimé uniquement dans les cellules corticotropes et ce, à partir du jour e12.0. J'ai montré que NeuroD1 était aussi requis pour la différenciation des cellules corticotropes, mais pas pour leur détermination.

Comme Tpit et NeuroD1 ont un rôle essentiel à jouer dans la différenciation des cellules corticotropes, j'ai entrepris l'identification des facteurs responsables de leur activation. Dans les événements de différenciation qui impliquent NeuroD1, son expression dépend de celle d'autres facteurs bHLH, les neurogénines (ngn). Ngn2 est exprimé dans l'hypophyse à e12,5 mais il n'est toutefois pas nécessaire à l'expression de NeuroD1. En ce qui concerne Tpit, j'ai déterminé la structure de son ADNc ainsi que le site d'initiation de la transcription, ce qui est la première étape visant à caractériser les éléments régulateurs de son promoteur.

À l'échelle moléculaire, Tpit lie le promoteur de la POMC sur un site adjacent à celui de Pitx1 et ces deux facteurs dépendent l'un de l'autre pour activer la transcription du gène de la POMC. En outre, Tpit et NeuroD1/Pan1 interagissent eux aussi de façon synergique pour activer le gène de la POMC. Puisque cette synergie dépend de Pitx1 et que NeuroD1/Pan1 interagit avec Pitx1, ceci suggère que Tpit, Pitx1 et NeuroD1/Pan1 forment un complexe transcriptionnel histospcifique requis pour l'expression de la POMC. Ce complexe pourrait être le point de convergence de signaux et/ou de voies de détermination qu'il reste à identifier pour la différenciation des corticotropes à e12,5.

Mots clés : bHLH, boîte T, hypophyse, Pitx, *T-box*, transcription.

ABSTRACT

The pro-opiomelanocortin (POMC)-expressing corticotrophs are the first hormone-producing cells of the pituitary to reach terminal differentiation. Cell-specific transcription of the POMC gene was shown to rely, at least in part, on the synergistic action of the homeobox transcription factor Pitx1 and bHLH dimers containing NeuroD1 and ubiquitous Pan1. However, these factors alone cannot account for cell-specific transcription of POMC.

Analysis of POMC transcriptional regulation led me to clone a novel T-box transcription factor, Tpit, that acts together with Pitx1 on POMC transcription. Expression of Tpit appears to be entirely restricted to pituitary POMC lineages, both corticotroph and melanotroph. Tpit expression starts at about e12.5 in corticotrophs of mouse embryos, later in melanotrophs and it is maintained in the adult gland. In contrast, Tpit is never expressed in POMC neurons of the hypothalamus. Further, gain and loss-of-function experiments showed that Tpit was required for differentiation of both lineages but not for their commitment.

In the pituitary gland, expression of NeuroD1 starts at e12,0 and is restricted to corticotrophs. I showed that NeuroD1 was also required for corticotroph differentiation but not for commitment.

Since Tpit and NeuroD1 are essential for corticotroph differentiation, I undertook the identification of earlier upstream factors. In differentiation events

where NeuroD1 is involved, its expression depends on other bHLH factors, neurogenins (ngn). Ngn2 is expressed in the pituitary at e12.5. However, it is not required for NeuroD1 expression. As for Tpit, I determined its cDNA structure and its transcription initiation site. This is the first step to identify the regulatory elements of its promoter.

Tpit binds the POMC promoter at a site that is contiguous to the Pitx1 binding site and these two factors require each other for transcriptional activity on the POMC promoter. In addition, Tpit and NeuroD1/Pan1 exert synergism on the POMC gene. Since that synergism is Pitx1-dependent and NeuroD1/Pan1 interacts with Pitx1, this suggests that tissue-specific regulation of POMC transcription depends on a complex containing Pitx1, Tpit and NeuroD1/Pan1. This complex may be the point of convergence of different early differentiation signals and/or pathways that remain to be identified for onset of corticotroph differentiation at e12.5.

Key words : bHLH, Pitx, pituitary, T-box, transcription.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	v
Tableaux	xiv
Figures	xv
Sigles et abréviations	xvii
Remerciements	xviii
Avant-propos	xix
Chapitre 1 : INTRODUCTION	1
1.1 De l'anatomie comparée à la biologie moléculaire du développement	2
1.2 Un modèle de choix pour étudier la différenciation : l'hypophyse	5
1.2.1 Anatomie de l'hypophyse	5
1.2.2. Hormones hypophysaires	6
1.2.3. Relations physiologiques entre l'hypothalamus et l'hypophyse	10
1.3 Développement de l'hypophyse	11
1.3.1 Origine des cellules de l'hypophyse	11
1.3.2 Développement anatomique de l'hypophyse	13
1.3.3 T/ebp (Nkx2.1) et initiation du développement hypophysaire	15
1.3.4 Contrôle moléculaire du développement précoce de l'adénohypophyse (e8,5 – e12,5)	17
1.3.4.1 Molécules exprimées dans l'ectoderme oral à e8,5	18

1.3.4.1.1 Rpx (Hesx-1)	18
1.3.4.1.2 Pitx1 (Ptx1, P-Otx, Otlx2, Backfoot) et Pitx2 (Ptx2, Rieger)	19
1.3.4.1.3 Shh	20
1.3.4.1.4 Pax6	21
1.3.4.1.5 Isl1	22
1.3.4.2 Facteurs de croissance provenant du diencephale ventral	23
1.3.4.2.1 BMP4	23
1.3.4.2.2 FGF8 et induction de Lhx3 (P-Lim, Lim3) et Lhx4 (Gsh4)	25
1.3.4.3 Maturation de la poche de Rathke : BMP 2, GATA2 et autres marqueurs	28
1.3.5 Contrôle moléculaire de la différenciation de la lignée corticotrope (ACTH)	31
1.3.5.1 Rôle des facteurs de croissance	31
1.3.5.2 Dépendance du positionnement sur l'axe ventro-dorsal ..	34
1.3.5.3 Un mécanisme d'exclusion latérale?	35
1.3.5.4 Rôle des activateurs transcriptionnels histo-spécifiques de la POMC	37
1.3.6 Lignées dépendantes de Pit1(GHF1) : somatotropes, lactotropes, thyrotropes	37
1.3.6.1 Prop-1	38
1.3.6.2 Pit1	39
1.3.6.3 Somatotropes (GH)	40
1.3.6.4 Lactotropes (PRL)	40
1.3.6.5 Thyrotropes (TSH)	41

1.3.7 Lignée gonadotrope (LH et FSH)	42
1.3.8 Lignée mélanotrope (α -MSH)	43
1.3.9 Synthèse des étapes moléculaires de la différenciation des lignées hypophysaires	45
1.4 Physiologie de l'ACTH et des autres peptides dérivés de la POMC et régulation hormonale de la POMC	48
1.4.1 Stress, ACTH et axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien	49
1.4.2 Régulation transcriptionnelle du gène de la POMC des cellules corticotropes dans le contexte de l'axe hypothalamo- hypophysaire-surrénalien	50
1.4.3 Rôle de l' α -MSH dans le contrôle de l'appétit et la pigmentation	53
1.4.4 Causes et conséquences d'une déficience en POMC	54
1.5 Régulation histospécifique de la POMC dans les cellules corticotropes	57
1.6 Facteurs de transcription à boîte homéo	60
1.6.1 Structure et liaison à l'ADN	61
1.6.2 Classification des facteurs de transcription à boîte homéo	62
1.6.3 La famille Pitx	63
1.6.2.1 Pitx1	64
1.6.2.2 Pitx2	66
1.6.2.3 Pitx3	69
1.7 Facteurs de transcription à motif bHLH	70
1.7.1 Structure, liaison à l'ADN et dimérisation	70
1.7.2 Classification des facteurs bHLH	70
1.7.3 Facteurs bHLH et différenciation cellulaire	71

1.7.3.1 Facteurs bHLHs neurogéniques, NeuroD1 et neurogénèse	72
1.7.3.2 NeuroD1 (BETA2) et régulation du gène de l'insuline	74
1.7.3.3 Cascades de facteurs bHLH neurogéniques dans la différenciation cellulaire	76
1.8 Facteurs de transcription à boîte T	77
1.8.1 Structure et activité transcriptionnelle	79
1.8.2 Facteurs à boîte T et développement	81
1.9 Objectifs de ce travail	85
 Chapitre 2 : A PITUITARY CELL-RESTRICTED T BOX FACTOR, TPIT, ACTIVATES POMC TRANSCRIPTION IN COOPERATION WITH PITX HOMEOPROTEINS	 87
2.1 Summary	88
2.2 Introduction	88
2.3 Results	88
2.3.1 Tpit is a T-box factor closely related to Brachyury (T)	94
2.3.2 Tpit is only present in pituitary POMC-expressing cells	96
2.3.3 Tpit and Pitx1 are jointly required for activation of POMC transcription	98
2.3.4 Specificity of cooperation between Pitx and T-box factors	100
2.3.5 Tpit binds the T-box element	101
2.3.6 Tpit initiates POMC cell differentiation	103
2.3.7 TPIT gene mutations in patients with isolated ACTH deficiency	105
2.4 Discussion	108

2.4.1 T-box genes, Tpit and cell differentiation	108
2.4.2 Cooperation between Tpit and Pitx1	111
2.4.3 Developmental significance of interaction between Pitx and T-box transcription factors	113
2.5 Experimental procedures	114
2.5.1 Cell culture and transient transfection assays	114
2.5.2 Plasmids and oligonucleotides	114
2.5.3 RNA analysis, degenerate PCR and cDNA library screening	115
2.5.4 Gel retardation assay	116
2.5.5 Preparation and characterization of affinity-purified anti-Tpit antibodies	116
2.5.6 Immunohistochemistry, section and wholemount in situ hybridization	117
2.5.7 Generation of transgenic mice	117
2.5.8 Analysis of human TPIT gene	118
2.6 Acknowledgements	118
2.7 References	119
Chapitre 3 : TPIT-INDEPENDENT FUNCTION OF NEUROD1 (BETA2) IN PITUITARY CORTICOTROPH DIFFERENTIATION	128
3.1 Abstract	129
3.2 Introduction	129
3.3 Results.....	132
3.3.1 Synergism and physical interactions between bHLH factors and Tpit	133

3.3.2 Requirement for NeuroD1 in corticotroph differentiation	135
3.3.3 The NeuroD1-dependent differentiation delay is transient	140
3.3.4 Neurogenins 1, 2 and 3 are not required for POMC expression	142
3.4 Discussion	146
3.5 Materials and methods	150
3.5.1 Mice antibodies and immunohistochemistry	150
3.5.2 Plasmids and transfection assays	151
3.5.3 Pulldown assay	151
3.6 Acknowledgements	152
3.7 References	152
Chapitre 4 : DISCUSSION	159
4.1 Relations développementales entre les corticotropes et les gonadotropes	162
4.2 Relations développementales entre les corticotropes et les mélanotropes	169
4.3 Induction de la voie corticotrope	170
4.4 Rôle des corticotropes dépendantes de NeuroD1 au sein du développement hypophysaire	176
4.5 Intégration des régulations histospécifique et hormonale de la POMC	179
4.6 Conclusion	181
Bibliographie	183
ANNEXES	203

Annexe I : COMPARAISON DES PATRONS D'EXPRESSION DE PITX1 DANS LES STOMODEUMS CHEZ LA SOURIS ET LE POULET	204
I.1 Introduction	204
I.2 Résultats et discussion	204
I.3 Matériel et méthodes	206
I.3.1 Hybridation <i>whole mount</i>	206
I.3.2 Clonage de cPitx1	207
I.3.1 Hybridation <i>in situ</i>	207
Annexe II : 3 KB DE RÉGIONS 5' NON TRANSCRIPTES SONT INSUFFISANTES POUR ACTIVER L'EXPRESSION DE TPIT	208
II.1 Introduction	208
II.2 Résultats et discussion	208
II.2.1 Structure de l'ADNc de Tpit	208
II.2.2 Identification des régions en 5' du site de l'initiation de Tpit ...	210
II.3 Matériel et méthodes	214
II.3.1 Extention d'amorce	214
II.3.2 Criblage	214
II.3.3 Construction du transgène	215
II.3.4 Génération des souris transgéniques, génotypage, détection de la β -galactosidase	215
ANNEXE III : QUELQUES CONSIDÉRATIONS ÉVOLUTIVES	216

TABLEAUX

Chapitre 1 : INTRODUCTION

Tableau I-1 : Relations entre les symptômes causés par une déficience liée à la POMC et les sites d'expression de la POMC 55

Tableau I-2 : Facteurs à boîte T impliqués dans des pathologies congénitales et cancers 84

Chapitre 4 : DISCUSSION

Tableau IV-1 : Code combinatoire transcriptionnel de différenciation des lignées hypophysaires 163

FIGURES

Chapitre 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1 : Structure anatomique de l'hypophyse.....	7
Figure 1.2 : Origine embryonnaire des cellules de l'hypophyse.....	14
Figure 1.3 : Organogénèse de l'hypophyse chez la souris	16
Figure 1.4 : Différenciation des lignées hormonales hypophysaires	47
Figure 1.5 : Axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien	51
Figure 1.6 : Régulation transcriptionnelle de la POMC	58

Chapitre 2 : A PITUITARY CELL-RESTRICTED T BOX FACTOR, TPIT, ACTIVATES POMC TRANSCRIPTION IN COOPERATION WITH PITX HOMEOPROTEINS

Figure 2.1 : A T-box binding site is required for Pitx1 activation of POMC transcription	93
Figure 2.2 : Cloning of Tpit, a new T-Box Factor	95
Figure 2.3 : Tpit is only expressed in POMC-expressing cells of the pituitary gland	97
Figure 2.4 : Tpit and Pitx1 activate POMC transcription synergistically in heterologous cells	99
Figure 2.5 : Tpit binds to the T-Box element	102
Figure 2.6 : POMC cell differentiation induced by Tpit in vivo	104
Figure 2.7 : Human TPIT gene mutations in isolated pituitary ACTH deficiency	106

Chapitre 3 : TPIT-INDEPENDENT FUNCTION OF NEUROD1(BETA2) IN PITUITARY CORTICOTROPH DIFFERENTIATION

Figure 3.1 : Tpit and Pan1/NeuroD1 heterodimers interact to activate POMC transcription	134
Figure 3.2 : Delayed corticotroph differentiation in e13.5 NeuroD1 (BETA2)-null mice	137
Figure 3.3 : Corticotroph deficiency is restricted to this lineage	139
Figure 3.4 : Recovery of corticotroph differentiation at e16.5 in NeuroD1(BETA2)-deficient mice	141
Figure 3.5 : Neurogenin 2 is expressed during early pituitary development	143
Figure 3.6 : Neurogenin 1 and Neurogenin 2 genes are not required for differentiation of pituitary corticotrophs	145
Figure 3.7 : NeuroD1 and Tpit are both required for corticotroph differentiation, but not for commitment	147

Chapitre 4 : DISCUSSION

Figure 4.1 : Modèle de différenciation des lignées hormonales hypophysaires incluant Tpit	161
Figure 4.2 : Importance de Tpit dans le maintien des lignées POMC ...	166

ANNEXES

Figure I-1 : Conservation de l'expression de Pitx1 chez la souris et le poulet	205
Figure II-1 : Structure de l'ADNc de <i>Tpit</i>	209
Figure II-2 : Analyse des régions 5' régulatrices de l'expression de <i>Tpit</i>	211

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Aa : acide aminé
ACTH : hormone adrénocorticotropique
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ANF : peptide atrionutriurétique
ANR : bourrelet neural antérieur
ARNm : acide ribonucléique messenger
BHLH : hélice-boucle-hélice basique
BMP : *Bone Morphogenetic Protein*
CLIP : peptide pseudo-corticotropique du lobe intermédiaire
Cnx40 : Connexine 40
CRH : hormone de relâchement des corticotropines
DII : Delta-like
DR : répétition directe
E. Coli : *Escherischia Coli*
EX,x : jour embryonnaire (post-coïtum) X,x
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FSH : hormone folliculo-stimuline
GH : hormone de croissance
GR : récepteur aux glucocorticoïdes
 α GSU : sous-unité glycoprotéique α
HD : homéodomaine
HTH : hélice-tour-hélice
kb : kilopaire de bases
LA : lobe antérieur
LH : hormone lutéinisante
LI : lobe intermédiaire
LIF : *leukemia inhibitory factor*
LP : lobe postérieur
MBP : *maltose binding protein*
 α -MSH : hormone mélano-stimuline α
 γ -MSH : hormone mélano-stimuline γ
pb : paire de base
PC : proconvertase
PCR : *polimerase chain reaction*
PKA : phosphokinase A
POMC : pro-opiomélanocortine
PRL : prolactine
RACE : *rapid amplification of cDNA ends*
RH : hormone de relâchement
RP : poche de Rathke
RT : transcriptase inverse
TGF : *Transforming Growth Factor*
TSH : hormone thyro-stimuline

REMERCIEMENTS

Je voudrais dans un premier temps remercier Jacques Drouin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de génétique moléculaire à l'IRCM, pour son encadrement et ses conseils. Je souhaite aussi souligner l'apport de toute l'équipe du laboratoire, les permanents, Michel Chamberland, Yves Gauthier et Lise Laroche, et tous les étudiants et post-docs qui y sont passés, ainsi que des gens d'autres groupes, des plateaux technologiques et du personnel de l'IRCM pour les coups de main, petits ou grands, directs ou indirects, dans la réalisation de mon projet ainsi que pour les bons moments passés ensemble au laboratoire et hors du laboratoire.

Je tiens aussi à remercier les personnes et organismes qui m'ont soutenu financièrement : le CRSNG, l'IRCM, le CRM, le Programme de biologie moléculaire et Jacques Drouin.

Merci aussi à Vivianne Jodoin du Programme de biologie moléculaire à l'Université de Montréal.

AVANT-PROPOS

SUR LA MORTIFICATION SPONTANÉE DE LA QUEUE
CHEZ LA SOURIS NOUVEAU-NÉE
ET SUR L'EXISTENCE D'UN CARACTÈRE (FACTEUR) HÉRÉDITAIRE
« NON VIABLE »

Par N. DOBROVOLSKAĀ-ZAVADSKAĀ

Au cours de nos expériences, sur la possibilité de modifier le patrimoine héréditaire en traitant les glandes génitales par les rayons X, faites sur la Souris, nous avons obtenu, parmi les descendants des Souris irradiées, des souriceaux chez lesquels la queue, tout entière ou en partie, se trouvait dans un état de gangrène sèche. [...] Ces petits peuvent se développer aussi bien que les normaux, et on obtient des Souris brachyures [...] Cela signifie que le gène (ou les gènes) correspondant à cet organe existait dans la matière héréditaire de l'animal, que ce gène a déterminé le développement de cet appendice, mais qu'il lui manquait quelque chose pour assurer la vie ultérieure et le développement de l'organe.

Compte-rendus hebdomadaires de la Société de Biologie et de ses filiales, séance du 18 juin 1927.

The *Brachyury* gene encodes a novel DNA binding protein

Andreas Kispert and Bernhard G. Herrmann

Brachyury (T) mutant embryos are deficient in mesoderm formation and do not complete axial development. [...] These and other data suggested that the T gene might be involved in the control of transcriptional regulation. [...] We suggest that the T protein is involved in the control of genes required for mesoderm formation, and for the differentiation and function of chorda mesoderm.

EMBO Journal 1993 Aug;12(8):3211-20

Chapitre 1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1.1 De l'anatomie comparée à la biologie moléculaire du développement

Depuis les observations d'Aristote sur le développement des oiseaux jusqu'à la fin du XIXème siècle, l'embryologie constitua essentiellement une branche de l'anatomie comparée. L'intérêt envers cette discipline suscité par les débats sur la théorie darwinienne de l'évolution, conjugué aux invitations à l'expérimentation lancées par Wilhem Roux, mena au développement d'une embryologie expérimentale.

Six ans après le lancement de *Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organischen* (Archives des mécanismes développementaux des organismes) par Roux, de Vries et ses collègues publiaient la redécouverte des lois fondatrices de la génétique de Mendel. Bien que l'étude de la transmission des caractères et l'étude du développement de ces caractères à partir du zygote soient deux aspects de la même question qui est de comprendre un phénotype, la génétique et l'embryologie prirent leurs distances l'une de l'autre et les rivalités apparurent très vite. Dans les années 30, les généticiens étaient devenus autonomes et très bien établis. Beaucoup commençaient à penser que l'embryogenèse finirait par se comprendre en terme de gènes et que l'approche embryologique était désuète. Le généticien

Richard Goldschmidt déclara : «Development is, of course, the orderly production of pattern, and therefore after all, genes control pattern.»

Ce à quoi les embryologistes soulevèrent deux objections :

- Comment expliquer que les chromosomes pouvaient être responsables de la grande diversité des types cellulaires d'un organisme alors qu'ils étaient identiques dans toutes les cellules?
- Comment se faisait-il que les gènes connus de l'époque affectaient presque uniquement des structures de développement terminal? Les généticiens devaient montrer que les gènes pouvaient aussi contrôler le développement précoce.

Des chercheurs formés dans les deux disciplines, comme Gluecksohn-Shoenheimer et Waddington, tentèrent des rapprochements. Ainsi, Gluecksohn-Shoenheimer montra que les mutations du locus T des souris dites brachyures, utilisées pour étudier l'hérédité chez les mammifères, étaient associées à des malformations au niveau du mésoderme postérieur dans l'embryon. De son côté, Waddington montra comment plusieurs gènes qui causaient des malformations de l'aile de drosophile affectaient en fait les primordia développementales à l'origine de ces ailes. Ainsi, ces généticiens du développement purent commencer à lever une des objections des embryologistes.

Toutefois, pour réussir à répondre complètement aux embryologistes, il fallut développer une meilleure compréhension de la nature du gène et de son fonctionnement. Avery et ses collègues lui fournirent un support d'ADN dans les années 40. Et Beadle et Tatum l'associèrent à la production d'une protéine. Ceci établit les bases pour une nouvelle approche moléculaire de la biologie du gène qui prit son envol la décennie suivante avec la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick. Les outils de cette biologie moléculaire permirent de confirmer l'implication des gènes dans le développement précoce avec, par exemple, la découverte des gènes homéotiques attribuée à Lewis, Nüsslein-Volhard et Wieschaus.

Le début de la réponse à la deuxième objection vint de Monod, Jacob et Lwoff. En travaillant sur la production des enzymes du métabolisme du lactose chez *E. coli* en fonction de la présence ou non de ce sucre dans le milieu, ils jetèrent les bases du concept de régulation génique. En étudiant par la suite la régulation des gènes eucaryotes à l'échelle moléculaire, on put ainsi répondre aux embryologistes : bien que les gènes soient tous présents dans toutes les cellules, ils doivent être activés et ils le sont différenciellement selon le type cellulaire.

L'embryologie ne s'est pas réduite à une branche de la génétique. Mais, désormais, à l'intersection de la première et de la biologie moléculaire, fille de la deuxième, certaines questions de développement se posent concrètement en terme de gènes et de leur régulation. Dans le cas de la différenciation, par exemple, on

cherche à comprendre comment un gène est activé dans un type cellulaire plutôt que dans un autre à un moment particulier. En d'autres mots, une façon d'aborder la différenciation d'une lignée cellulaire est d'étudier les mécanismes de régulation histo-spécifiques d'un gène marqueur de cette lignée et leur mise en place au cours du développement.

1.2 Un modèle de choix pour étudier la différenciation : l'hypophyse

L'hypophyse est une glande constituée de plusieurs lignées cellulaires qui se différencient selon un patron très bien caractérisé au cours du développement et qui sont chacune identifiées par la production spécifique d'une hormone.

L'hypophyse constitue donc un excellent modèle d'étude de la différenciation cellulaire grâce à l'analyse des mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes hormonaux hypophysaires et de la mise en place de ces mécanismes au cours du développement.

1.2.1 Anatomie de l'hypophyse

L'hypophyse est "posée" sur la selle turcique, une région de l'os basisphénoïde qui constitue la base du crâne et est située sous l'hypothalamus avec lequel elle est reliée anatomiquement et physiologiquement par la tige

hypophysaire (ou pituitaire) (Fig 1.1 A, B). L'hypophyse est constituée de trois lobes désignés antérieur, intermédiaire et postérieur. Les lobes antérieur et intermédiaire forment la partie glandulaire de l'hypophyse ou adénohypophyse et le lobe postérieur la partie neurale ou neurohypophyse. L'adénohypophyse est une région productrice d'hormones alors que la neurohypophyse est en fait constituée de terminaisons nerveuses de neurones qui contiennent des granules de sécrétion d'hormone. Les noyaux de ces neurones sont localisés dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus et leurs fibres nerveuses passent par la tige hypophysaire. Dans le lobe postérieur, on retrouve aussi des pituicytes qui sont des cellules de type glial et qui ont un rôle de support envers ces terminaisons nerveuses.

1.2.2. Hormones hypophysaires

Deux hormones sont relâchées des terminaisons nerveuses du lobe postérieur. La première, l'hormone antidiurétique ou vasopressine, permet la réabsorption d'eau des tubules collecteurs des reins et agit sur la pression artérielle. La deuxième, l'ocytocine, agit sur les contractions utérines et la lactation.

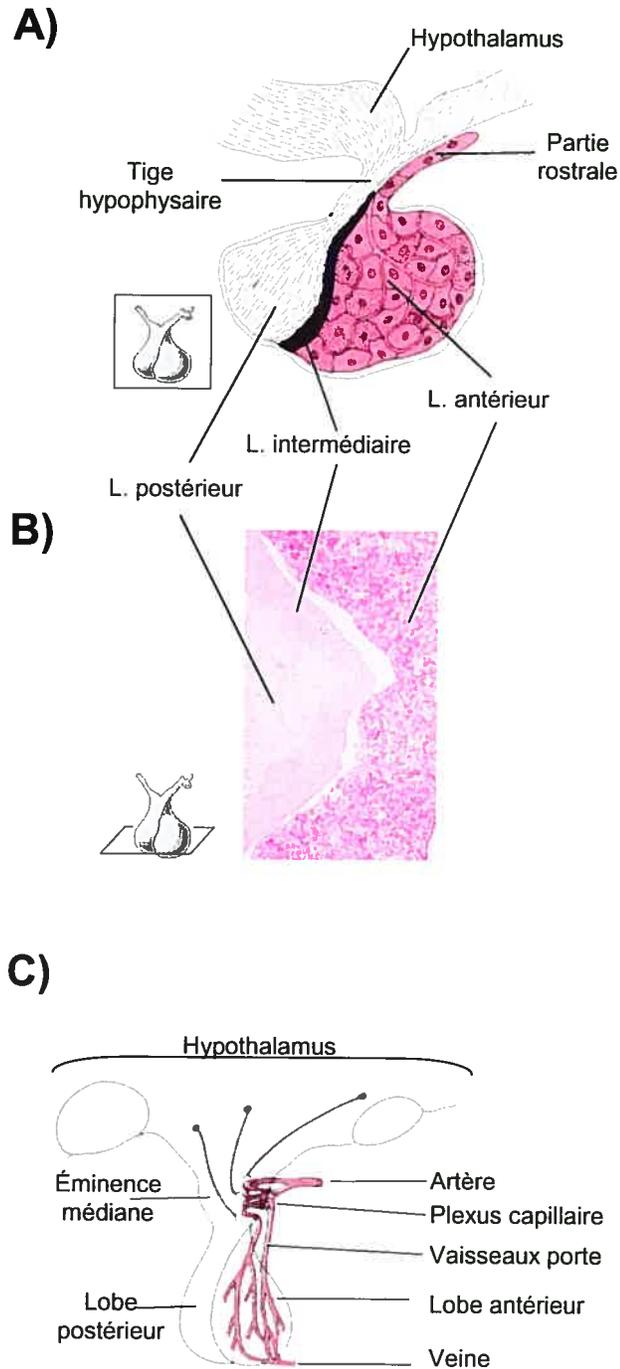


Figure 1.1 : Structure anatomie de l'hypophyse.

A) Schéma d'une coupe sagittale d'une hypophyse humaine adulte identifiant les trois lobes. D'après Guyton (1990).

B) Photo prise au laboratoire d'une coupe frontale d'une hypophyse de souris adulte.

C) Schéma représentant le système porte de la circulation sanguine dans l'hypophyse. D'après Guyton (1990).

Six hormones sont produites dans le lobe antérieur sous le contrôle des facteurs hypothalamiques :

Hormone adrénocorticotropique (ACTH) : produite par les corticotropes, elle permet la réponse métabolique au stress en agissant sur la production de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. (Voir Axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien à la section 1.4)

Hormone thyroïdostimuline (TSH) : produite par les thyrotropes, elle stimule la production d'hormones thyroïdiennes qui augmentent le métabolisme.

Prolactine (PRL) : produite par les lactotropes, elle agit sur les glandes mammaires et la production de lait

Les gonadotropines (hormone lutéinisante [LH] et la folliculo-stimuline [FSH]) : produites par les gonadotropes, la première agit sur l'ovulation et sur la production des hormones sexuelles par les ovaires ou les testicules et la deuxième agit sur le développement des ovules et des spermatozoïdes.

Hormone de croissance (GH) : produite par les somatotropes, elle n'agit pas sur une glande-cible en particulier, contrairement aux autres hormones du lobe antérieur, mais sur la croissance de tous les tissus qui en sont capables comme les os par exemple.

Les hormones, TSH, LH et FSH sont en fait composées de deux sous-unités. La sous-unité α (α GSU) est une glycoprotéine commune aux trois hormones alors que la sous-unité β est spécifique.

Dans le lobe intermédiaire, une seule population de cellules, les mélanotropes, produit une seule hormone, l' α -mélano-stimuline (α -MSH), qui agit sur la production du pigment mélanine par les mélanocytes de la peau. Il est à noter que, chez l'humain, contrairement aux rongeurs et à d'autres animaux comme les amphibiens dont la couleur de la peau et/ou du pelage change avec les saisons, le lobe intermédiaire est presque inexistant.

L' α -MSH et l'ACTH sont issues d'une même protéine précurseure, la pro-opiomélanocortine (POMC). Celle-ci subit un processus de maturation spécifique à chaque lignée (Eipper and Mains, 1980). Dans les deux, la POMC est clivée par la proconvertase 1 (PC1), ce qui génère entre autres un fragment polypeptidique constitué de 39 acides aminés équivalent à l'ACTH. Dans les mélanotropes, il existe une PC2 qui coupe ce polypeptide et produit l' α -MSH qui est constituée des 13 premiers acides aminés (Seidah et al., 1991; Marcinkiewicz et al., 1993). La frontière entre les lobes intermédiaire et antérieur n'est pas toujours bien visible, en particulier dans la région caudale de l'hypophyse (voir, par exemple, fig 1.3 F,G). Histologiquement, on observe une continuité entre les cellules POMC des deux lobes (par exemple, fig. 3.4 A). Il n'est pas établi s'il y a une frontière nette ou s'il y

a chevauchement entre les deux populations de cellules POMC. Les relations entre ces deux lignées ne sont pas claires non plus.

1.2.3. Relations physiologiques entre l'hypothalamus et l'hypophyse

La nature du lobe postérieur de l'hypophyse indique sa relation anatomique et physiologique avec l'hypothalamus, mais il existe aussi une relation physiologique de contrôle exercé par l'hypothalamus sur la production hormonale de l'adénohypophyse par l'intermédiaire du système circulatoire porte (Fig 1.1 C). Les vaisseaux sanguins qui irriguent l'adénohypophyse passent d'abord par l'éminence médiane qui est la région de l'hypothalamus qui est située juste au-dessus de la tige hypophysaire. L'artère hypophysaire qui y pénètre se divise en capillaires dans lesquels se déversent différents facteurs de contrôle hypophysaire. Ces capillaires sortent de l'éminence médiane et fusionnent en vaisseaux qui forment le système porte hypothalamique-hypophysaire qui descend le long de la tige hypophysaire vers l'adénohypophyse. Les vaisseaux du système porte se divisent à nouveau en plus petits vaisseaux pour irriguer l'hypophyse et amener les facteurs de contrôle hypothalamiques aux lignées productrices d'hormones avant de ressortir de la glande en fusionnant en veine hypophysaire.

Le contrôle effectué par les facteurs hypothalamiques est soit positif et on parle alors d'hormones de relâchement (RH) soit inhibiteur. L'ACTH, la GH, la

TSH, la LH et la FSH sont principalement sous le contrôle d'hormones de relâchement alors que la PRL semble être uniquement sous contrôle inhibiteur.

C'est ce contrôle exercé par les facteurs hypothalamiques, additionné aux boucles de rétroaction exercées par les hormones hypophysaires elles-mêmes, qui fait de l'hypophyse un centre d'intégration des systèmes nerveux et endocrine dans l'organisme.

1.3 Développement de l'hypophyse

L'hypophyse est d'origine ectodermale double puisque l'adénohypophyse provient de la cavité orale de l'embryon (ou stomodeum) et la neurohypophyse du diencephale ventral, qui est la région du cerveau en développement qui donne aussi naissance à l'hypothalamus. Les deux parties de l'hypophyse se développent au contact l'une de l'autre.

1.3.1 Origine des cellules de l'hypophyse

C'est d'abord chez le poulet, puis chez le crapeau, qu'on a pu identifier le plus précocément les cellules qui seront recrutées pour former l'ébauche hypophysaire. Dans le but de cartographier le devenir des cellules de la partie la

plus antérieure de la plaque neurale ouverte de l'embryon, donc au début du stade de la neurula, Couly et Le Douarin ont réalisé des greffes de cellules de cailles dans les régions équivalentes d'embryons de poulet de stade similaire (Couly and Le Douarin, 1985; Couly and Le Douarin, 1987). Le suivi des cellules greffées était facile à faire puisque les cellules de cailles et de poulet présentent des différences histologiques. Kikuyama et al ont essentiellement fait la même chose avec des greffes de cellules de crapeau sur des congénères albinos (Kikuyama et al., 1993). Les deux groupes ont montré que les cellules progénitrices de l'adénohypophyse étaient localisées dans la partie médiane du bourrelet neural antérieur juste devant celles qui donneraient naissance à l'hypothalamus et la neurohypophyse (Fig 1.2A, C).

La fermeture antérieure du tube neural se fait par fusion des bourrelets antérieurs latéraux qui, en se contactant, créent une nouvelle région frontale plus antérieure que ne l'était le bourrelet neural antérieur. Ceci se produit du stade de développement à 4 somites à 13 chez le poulet (Fig 1.2B) et des jours e7,5 à e9,5 chez la souris (Fig 1.2C-E). Ces changements morphologiques placent aussi la future placode hypophysaire en position ventrale par rapport à la placode hypothalamique, qui est elle-même incluse dans le diencéphale ventral. De plus, la placode hypophysaire fait désormais partie intégrante de l'ectoderme épithélial oral, ou stomodéal, qui vient de se former (Fig 1.2B, E).

1.3.2 Développement anatomique de l'hypophyse

L'organogénèse hypophysaire commence au jour e9,0 chez la souris. À ce stade, l'embryon a terminé son retournement sur lui-même et une phase générale d'organogénèse débute (Fig 1.3A, B). En ce qui concerne le développement cranio-facial, l'épithélium du diencéphale ventral et celui de l'ectoderme oral sont accolés l'un à l'autre (Fig 1.3 C) (Schwind, 1928). L'épithélium stomodéal n'est séparé de l'épithélium endodermal du tube digestif que par une mince membrane qui ferme ce dernier (Fig 1.3B-9). Le contact direct entre ectodermes neural et oral sera perdu au cours du développement suite à une invasion mésenchymateuse, sauf dans la région où l'hypophyse se développe. Ce contact neural-oral est crucial pour le développement ultérieur de l'hypophyse, ainsi que l'ont montré des expériences de culture d'organes (Watanabe and Daikoku, 1979; Daikoku et al., 1982), suggérant ainsi l'échange de signaux inductifs essentiels à travers ce point de contact.

Vers e9,0, l'épithélium de la placode hypophysaire s'épaissit (Fig 1.3B-7) et s'invagine tout en gardant contact avec une partie du diencéphale ventral (Fig 1.3C,D-15). Cette invagination prend le nom de poche de Rathke. Vers e11,0, la poche de Rathke commence à se fermer pour s'isoler de la cavité buccale et former une ébauche hypophysaire (Fig 1.3E-15). Toutefois, une mince ouverture peut parfois rester en place. À partir de e12,0, il se produit de la prolifération cellulaire dans la partie rostro-ventrale de l'hypophyse primitive. Cette prolifération

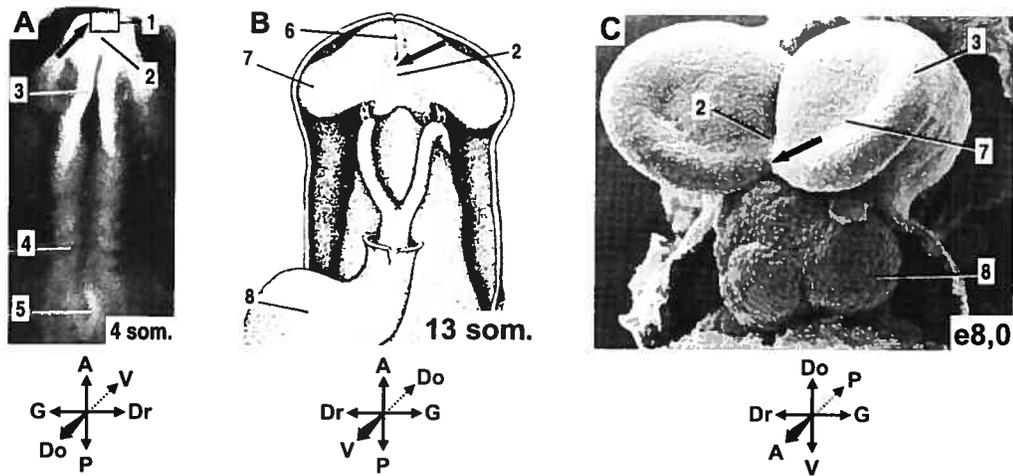
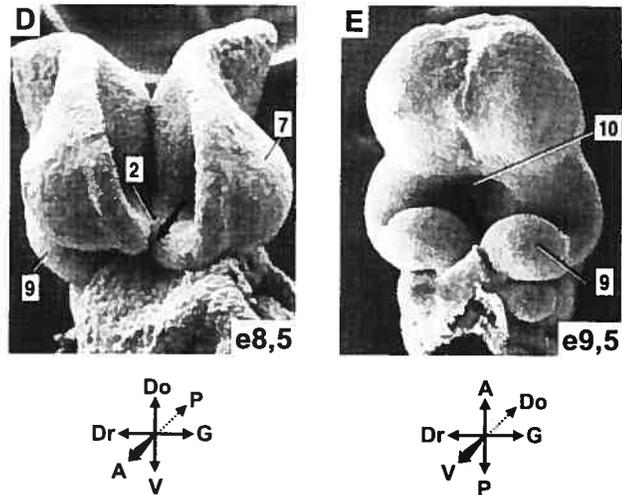


Figure 1.2 : Origine embryonnaire des cellules de l'hypophyse : Les cellules de l'hypophyse proviennent du bourrelet neural antérieur identifiable avec une vue dorsale de l'embryon de poulet (A) ou antérieure de celui de souris (C). La fermeture du tube neural antérieur par fusion du bourrelet neural (D) place les cellules de la placode hypophysaire en position ventrale chez les deux espèces (B,E). Photos tirées de Kaufman (1993)



Axes embryonnaires :

A : Antérieur, Do : Dorsal, Dr : Droite
G : Gauche, P : Postérieur, V : Ventral

- ↗ : Cellules qui formeront l'adénohypophyse
- 1 : Bourrelet neural antérieur
- 2 : Cellules qui formeront la neurohypophyse
- 3 : Bourrelet neural
- 4 : Somite

- 5 : Noeud de Hensen
- 6 : Neuropore antérieur fusionnant
- 7 : Placode optique
- 8 : Coeur
- 9 : Arc branchial
- 10 : Placode hypophysaire

mésenchymateuse se fait probablement par délamination de l'épithélium de la poche de Rathke et formera, avec l'épithélium antérieur de la poche de Rathke, le lobe antérieur (Fig 1.3F, G-17), alors que l'épithélium dorsal de la poche de Rathke deviendra le lobe intermédiaire (Fig 1.3 G-18). Du côté neural, vers e9,0, l'ectoderme du diencéphale ventral en contact avec l'épithélium oral commence à former lui aussi une invagination, l'infudibulum, (Fig 1.3 C-F-13). L'infudibulum s'isole lui aussi du diencéphale ventral formant ainsi l'ébauche de la tige hypophysaire et se développe en restant accolé à l'adénohypophyse pour former la neurohypophyse ou lobe postérieur (Fig 1.3 G-19).

À e12,5, les trois ébauches de lobes de l'hypophyse sont en place et identifiables. Et à la naissance, moins d'une semaine plus tard, l'hypophyse aura subi peu de changements anatomiques, à part la croissance cellulaire et quelques changements morphologiques causés par les pressions exercées par le cerveau en développement.

1.3.3 T/ebp (Tiff1 / Nkx2.1) et initiation du développement hypophysaire

Le lobe postérieur n'étant qu'un prolongement axonal de l'hypothalamus, les molécules importantes pour son développement pourraient être des molécules de

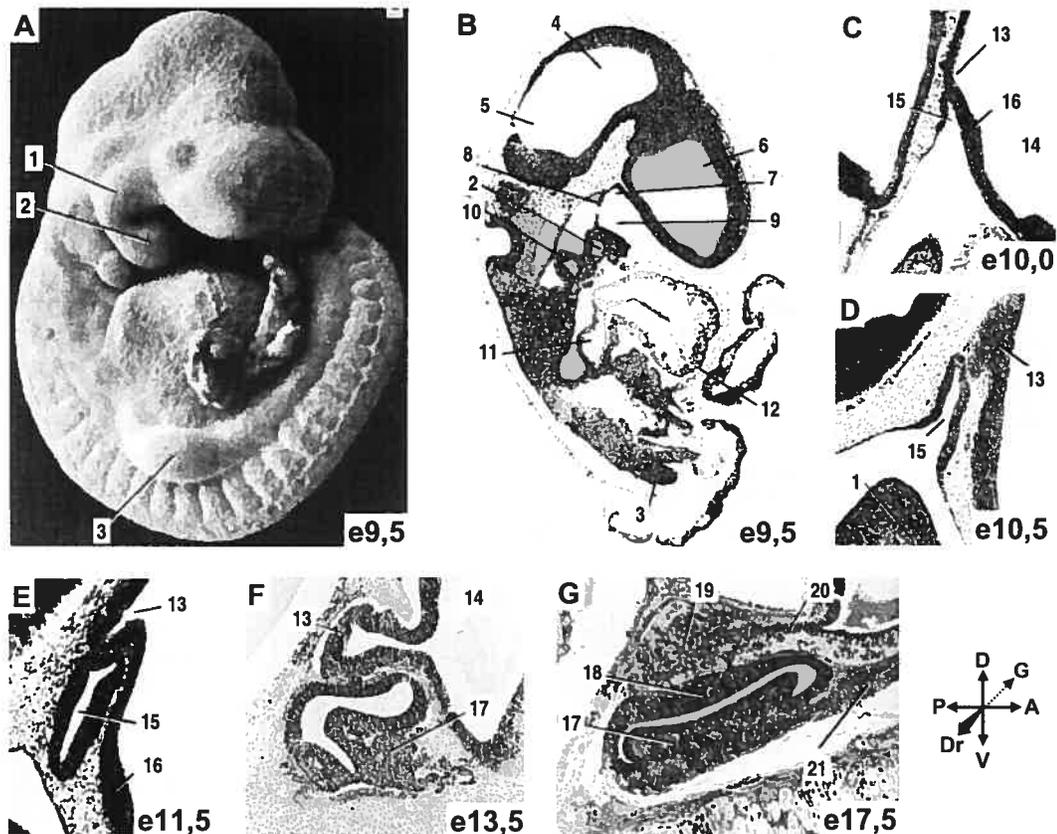


Figure 1.3 : Organogénèse de l'hypophyse chez la souris. Le développement de l'hypophyse débute à e9,5 au moment où l'embryon a terminé son retournement sur lui-même (A). La placode hypophysaire est situé juste devant la membrane oro-pharingée dans le stomodeum (B 7,8). La placode s'invagine pour former la poche de Rathke à e10,5 (C,D 15). Dans le même temps, l'infudibulum s'invagine lui aussi (C,D 13). Cette poche s'isole du stomodeum (E) et les trois lobes se mettent en place (F,G). Photos tirées de Kaufman (1993). A : Antérieur, Do : Dorsal, Dr : Droite, G : Gauche, P : Postérieur, V : Ventral

1 : Composante maxillaire du premier arc branchial	6 : Encéphale antérieur	14 : Troisième ventricule
2 : Composante mandibulaire du premier arc branchial	7 : Placode hypophysaire	15 : Poche de Rathke
3 : Bourgeon du membre antérieur	8 : Membrane bucco-pharingée	16 : Diencephale ventral
4 : Encéphale moyen	9 : Stomodeum	17 : Lobe antérieur
5 : Encéphale arrière	10 : Deuxième arc branchial	18 : Lobe intermédiaire
	11 : Oreillette	19 : Lobe postérieur
	12 : Myocarde ventriculaire	20 : Tige hypophysaire
	13 : Infundibulum	21 : Pointe rostrale

guidage axonal ou des molécules jouant un rôle durant le développement de l'hypothalamus. C'est le cas de T/ebp. Ce facteur de transcription à boîte homéo est exprimé au jour e8,5 dans le diencephale ventral (Lazzaro et al., 1991). Lorsqu'on réalise l'ablation génique de T/ebp, l'infundibulum ne se forme pas, indiquant que ce facteur est essentiel pour son apparition (Kimura et al., 1996).

Cependant, le phénotype de l'ablation génique de T/ebp cause un autre phénotype tout aussi spectaculaire : l'aplasie complète de l'adénohypophyse. À e9,5, il semble se former un début de formation de poche de Rathke mais le processus ne se poursuit pas et le rudiment est éliminé par apoptose (Takuma et al., 1998; Kimura et al., 1996). Ceci est une confirmation génétique de l'importance du diencephale ventral, et de signaux passant par le contact neural – oral, sur le développement de l'adénohypophyse.

1.3.4 Contrôle moléculaire du développement précoce de l'adénohypophyse (e8,5 – e12,5)

À l'échelle moléculaire, nous allons voir que le développement précoce de l'hypophyse correspond à l'établissement d'un axe ventro-dorsal dans la poche de Rathke. Cet axe est le fait de facteurs de croissance d'origine dorsale (BMP4, FGF8/10) et d'origine ventrale (BMP2, Shh). D'autres facteurs comme Wnt5A et Chordine pourraient participer à l'établissement de l'axe antéro-postérieur. Et il ne

semble pas nécessaire d'établir un axe latéral gauche-droite puisque, morphologiquement et histologiquement, l'hypophyse est un organe symétrique. C'est de l'établissement de ces axes, puis du passage à la phase de différenciation des lignées hypophysaires dont nous allons traiter maintenant.

Puisque l'adénohypophyse est induite à partir de l'ectoderme oral, on peut se demander comment se caractérise cet ectoderme oral juste avant l'induction de l'invagination de la poche de Rathke, en terme de molécules pertinentes au développement de cette dernière. Ajoutons tout de suite que certaines des molécules impliquées ont des rôles différents à jouer à diverses étapes du développement hypophysaire en combinaison avec d'autres molécules et qu'il y aura un résumé accompagné d'une figure pour récapituler le développement hypophysaire à la fin de cette section.

1.3.4.1 Molécules exprimées dans l'ectoderme oral à e8,5

1.3.4.1.1 Rpx (Hesx-1)

Rpx est un facteur de transcription à boîte homéo de la classe Paired qui contient un domaine répresseur transcriptionnel « eh-1 » dans sa région N-terminale. Il apparaît tôt au cours du développement dans le bourrelet neural antérieur. Son expression est maintenue dans l'ectoderme oral qui en dérive, puis

restreinte à la poche de Rathke avant de s'éteindre progressivement à partir du jour e11,5 au moment où la différenciation débute, pour disparaître complètement vers e14,0 (Hermesz et al., 1996; Somson et al., 1996). Ce facteur de transcription aurait un rôle à jouer dans la prolifération cellulaire. L'ablation génique de *Rpx* provoque deux phénotypes. Dans le premier, la poche de Rathke ne se forme tout simplement pas et dans le deuxième, elle est très déformée (Dattani et al., 1998). On peut interpréter ces deux phénotypes comme des défauts prolifératifs. Chez l'humain, on a pu associer des hypoplasies hypophysaires à des mutations dans le gène *RPX* (Dattani et al., 1998).

1.3.4.1.2 Pitx1 (Ptx1, P-Otx, Backfoot) et Pitx2 (Ptx2, Otlx2, Rieger)

Pitx1 et Pitx2 sont deux membres très semblables de la famille des facteurs de transcription à boîte homéo Pitx (Voir section 1.6.3). Leurs homéodomaines sont homologues à 96%. Les deux sont exprimés tôt dans l'ectoderme oral à partir de e8,0 et ils restent exprimés dans l'hypophyse tout au long de son développement et chez l'adulte (Lanctôt et al., 1997; Lanctôt et al., 1999a; Szeto et al., 1996; Gage and Camper, 1997; Mucchielli et al., 1996; Semina et al., 1996). L'ablation génique de Pitx1 affecte la différenciation ou la prolifération de certaines lignées hypophysaires comme les gonadotropes ou les thyrotropes, mais l'hypophyse se forme normalement (Szeto et al., 1999). Ce phénotype subtil malgré l'expression pan-hypophysaire de Pitx1 suggère une certaine redondance

avec Pitx2. Dans le cas de l'ablation génique de ce dernier, le développement de la poche de Rathke est bloqué au stade équivalent à celui atteint à e11,5. Celle-ci devient hypoplasique et seules les cellules corticotropes se différencient (Suh et al., 2002; Lin et al., 1999; Gage et al., 1999). Donc, bien qu'il y ait redondance fonctionnelle entre Pitx1 et Pitx2, Pitx1 ne peut pas compenser la perte de Pitx2 dans le développement précoce de l'ébauche hypophysaire.

1.3.4.1.3 Shh

Le morphogène Sonic Hedgehog est exprimé dans tout l'ectoderme oral chez l'embryon jusqu'au jour e12,0 (Treier et al., 2001). Mais son expression est exclue de la poche de Rathke lorsque celle-ci se forme. Ceci crée donc une frontière moléculaire entre l'épithélium oral et celui de la poche de Rathke (Treier et al., 1998). Shh est tout de même requis pour le développement de cette dernière, car le blocage de son action par l'inhibiteur *Hungtington interacting protein* en souris transgénique entraîne un arrêt du développement de la poche de Rathke sans aucune forme de différenciation cellulaire (Treier et al., 2001). De plus, Patched, le récepteur de Shh, est exprimé dans la poche de Rathke (Treier et al., 2001).

Le facteur de transcription HNF-3 β est un activateur de Shh (Tan et al., 2001). Il possède dans le stomodeum un patron d'expression similaire à celui de Shh et, comme Shh, il n'est pas exprimé dans la poche de Rathke (Lin et al., 1999).

L'inactivation de HNF-3 β affecte le développement des structures du mésoderme axial comme la notochorde et est létale au jour e9,5, soit au commencement de l'invagination de la poche de Rathke. Les effets de l'inactivation de HNF-3 β sur la formation de la poche de Rathke n'ont pas été rapportés (Ang and Rossant, 1994; Weinstein et al., 1994).

1.3.4.1.4 Pax6

Pax6 est un facteur de transcription à boîte homéo de la classe Paired qui est exprimé dans l'ectoderme oral qui s'invagine pour former la poche de Rathke, là où Shh n'est pas exprimé (Kioussi et al., 1999). Puis, dans la poche de Rathke, son expression se restreint à la moitié dorsale de la poche et cesse avant la naissance. Dans les souris *Small Eye*, mutantes pour *Pax6*, et dans l'ablation génique de *Pax6*, la poche de Rathke se développe normalement. Par contre, l'expression de certains marqueurs ventraux hypophysaires sur lesquels nous reviendrons plus loin, GATA2, Brn4, Isl-1 ainsi que SF1, un marqueur gonadotrope, se dorsalise. Ceci modifie les ratios entre les différentes lignées cellulaires productrices d'hormones. Le nombre de lactotropes et de somatotropes est réduit alors que celui de gonadotropes et de thyrotropes est augmenté. Le nombre de cellules corticotropes ne semble pas être affecté. (Kioussi et al., 1999)

Ajoutons que l'orthologue de drosophile de Pax6, Eyeless, interagit entre autre avec un facteur appelé Sine oculus (So). Or, des mutations dans le gène *SIX6*, l'orthologue humain de So, sont la cause d'hypoplasies hypophysaires (Gallardo et al., 1999).

1.3.4.1.5 Isl1

Isl1 est un facteur de transcription à boîte homéo de la classe LIM. À e8,5, il est exprimé dans la région de l'ectoderme oral qui est sous-jacente au diencephale ventral et qui va former la poche de Rathke, puis l'hypophyse. Son expression est maintenue dans la poche de Rathke mais elle diminue dans un gradient dorso-ventral bien visible à e10,5 pour être confinée ensuite à la région la plus ventrale et à la pointe rostrale (*rostral tip*, Fig 1.3 G-21), la région la plus antérieure de l'hypophyse (Ericson et al., 1998; Treier et al., 1998). Isl1 est une des protéines ventrales dont l'expression est dorsalisée dans l'ablation génique de Pax6 (Kioussi et al., 1999). Toutefois, cette exclusion mutuelle des patrons d'expression des deux facteurs est une caractéristique nouvelle dans la poche de Rathke puisque les deux sont coexprimés dans l'ectoderme oral.

Dans l'ablation génique de Isl1, les souris meurent aux environs du jour e10 (Pfaff et al., 1996). Toutefois Takuma et al ont pu observer que l'invagination de la poche de Rathke se forme mais que le développement s'arrête

à une poche rudimentaire suite à un défaut de prolifération cellulaire (Takuma et al., 1998). *Isl1* pourrait donc être un autre facteur impliqué dans la prolifération cellulaire et le blocage de la différenciation dans la poche de Rathke.

1.3.4.2 Facteurs de croissance provenant du diencephale ventral

1.3.4.2.1 BMP4

L'expression de *Isl1* dans la poche de Rathke est maintenue, et possiblement induite, par BMP4, un facteur de croissance de la famille TGF β produit par le diencephale ventral dans la région du contact neural – oral décrit plus haut à partir du jour e8,5. Cette région devient par la suite l'infundibulum et l'expression de BMP4 y a presque complètement disparue au jour e11,5 (Ericson et al., 1998; Treier et al., 1998). Ericson et al ont montré que des protéines de type BMP, incluant BMP4, pouvaient induire l'expression de *Isl1* *ex vivo* sur des poches de Rathke prélevées à e10,5 aux dépens du premier marqueur de différenciation terminale à ce stade, la POMC (Ericson et al., 1998). Par contre, ces observations n'ont pas pu être reproduites sur des ébauches hypophysaires prélevées à e11,5. Ce qui indiquerait qu'il y a une fenêtre temporelle durant laquelle les cellules sont sensibles à BMP4. Et d'ailleurs, l'expression de BMP4 cesse à la limite postérieure de cette fenêtre.

Cependant, même si BMP4 est capable d'induire l'expression de *Isl1* *ex vivo*, il n'a pas encore été montré que BMP4 est responsable de la toute première induction de *Isl1* dans l'ectoderme oral. Faute d'avoir regardé avant e8,5, on ne dispose pas de l'évidence circonstancielle que serait l'expression de BMP4 avant celle d'*Isl1*. L'ablation génique de BMP4 empêche l'induction initiale de la poche de Rathke (Takuma et al., 1998). Ceci suggère un rôle dans le maintien de l'expression de *Isl1* puisque les poches de Rathke *Isl1*^{-/-} sont plus développées que celles qui sont *BMP4*^{-/-}. Ou alors, BMP4 induirait en plus d'*Isl1* une deuxième protéine qui serait, celle-ci, requise pour l'induction de la poche de Rathke. Mais, il est aussi possible que ce blocage dans le développement soit un effet de la létalité précoce causée par l'inactivation de *BMP4*. Treier et al (1998) ont utilisé une autre approche pour étudier le rôle de BMP4 *in vivo*. Ils ont fait exprimer la protéine Noggin, qui est un agent bloquant de l'action de BMP4, dans l'ectoderme oral et la poche de Rathke de souris transgéniques grâce au promoteur de *Pitx1*. Chez ces souris, le développement de la poche de Rathke est maintenant arrêté à un stade équivalent à celui du jour e10,5. Toutefois, les auteurs n'ont pas analysé l'expression de *Isl1* dans ces souris. S'il est établi que BMP4 est essentiel pour le développement précoce de l'hypophyse, son rôle *in vivo* sur l'induction de l'expression de *Isl1* reste donc à clarifier.

Au moins une autre protéine semble être induite par BMP4, il s'agit de α GSU (Ericson et al., 1998; Treier et al., 1998). Cette sous-unité hormonale est exprimée dans toute la poche de Rathke et ne peut donc, à ce stade, être considérée

comme un marqueur de différenciation de lignées hormonales. Tout au plus, peut-on dire qu'il s'agit d'un marqueur de la poche de Rathke. L'induction d' α GSU par BMP4 dans des explants de poche de Rathke est fortement augmentée par Wnt5a (Treier et al., 1998). Wnt5a est fortement exprimé dans le diencéphale ventral et on ne lui connaît pas encore d'autre rôle dans le développement hypophysaire.

1.3.4.2.2. FGF8 et induction de Lhx3 (P-Lim, Lim3) et Lhx4 (Gsh4)

FGF8, un facteur sécrété, est exprimé à partir du jour e9,5 dans l'infundibulum, soit un jour après l'induction de T/ebp et BMP4 (Treier et al., 1998). L'ablation génique de FGF8 est létale pour l'embryon au stade de la gastrulation et ne renseigne pas sur le rôle de ce facteur dans le développement de l'hypophyse (Meyers et al., 1998). Cependant, l'importance de FGF8 peut être montrée en analysant les événements en aval de FGF8. Ericson et al ont montré d'une part que FGF8 pouvait restreindre l'expression de Isl1 et α GSU dans des explants de poche de Rathke à e10,5, soit une action contraire à celle de BMP4 (Ericson et al., 1998). Ceci est en accord avec l'observation de la régression dorso-ventrale du domaine d'expression de Isl1 suite à l'apparition de FGF8 dans l'infundibulum. Par ailleurs, ces auteurs et d'autres ont aussi montré que FGF8 pouvait induire l'expression de Lhx3 (Ericson et al., 1998; Treier et al., 2001; Takuma et al., 2001).

Lhx3 et Lhx4 sont deux facteurs de transcription à boîte homéo de la sous-famille LIM très semblables. Ils sont détectés exclusivement dans la poche de Rathke à partir du jour e9,5 (Sheng et al., 1996; Sheng et al., 1997). À e12,5, Lhx4 est restreint au lobe antérieur en développement alors que Lhx3 est encore exprimé dans toute la glande primitive. Chez l'adulte, Lhx4 est à peine détectable tandis que Lhx3 est encore exprimé dans l'adénohypophyse, quoique faiblement dans le lobe intermédiaire.

Dans les souris *T/ebp -/-*, Lhx3 et 4, tout comme FGF8 mais contrairement à BMP4, sont indétectables (Takuma et al., 1998). Ceci suggère que *T/ebp* agit en amont de FGF8 et Lhx3 et 4. D'autres données suggèrent que *Pitx1*, qui est exprimé tôt dans l'ectoderme oral, participe aussi à la régulation de Lhx3 (Tremblay et al., 1998). En outre, l'ablation génique de *Pitx2* entraîne la disparition de l'expression de Lhx3 et Lhx4 vers e13,5 après une induction initiale (Lin et al., 1999; Suh et al., 2002). Il est intéressant de constater que les ablations géniques de Lhx3 et Lhx4 rappellent celles de *Pitx2* et *Pitx1* respectivement. Comme dans le cas de celle de *Pitx2*, l'ablation génique de Lhx3 bloque le développement de l'hypophyse à un stade avancé de la poche de Rathke (Sheng et al., 1996). C'est à dire qu'il n'y a pas de prolifération cellulaire et que seules quelques cellules positives pour POMC sont détectées. Dans le cas de Lhx4, comme pour *Pitx1*, il y a une légère hypoplasie hypophysaire (Sheng et al., 1997; Szeto et al., 1999). En outre, l'inactivation génique de Lhx4 indique un retard dans l'apparition de l'expression de Lhx3, suggérant que Lhx4 participe à la régulation

de l'activation transcriptionnelle de Lhx3 (Raetzman 2002). De la même manière, les auteurs de ces travaux ont montré que Prop1, un facteur de transcription hypophysaire dorsalisant (voir section 1.3.6.1), participait positivement lui aussi à la régulation de Lhx3, quoique de façon moins forte que Lhx4. Il apparaît donc que l'expression de Lhx3 dépend de plusieurs facteurs de transcription et facteurs de croissance qui ont un rôle à jouer à plusieurs étapes du développement. Cette complexité de contrôle transcriptionnel correspond probablement au rôle essentiel que semble jouer Lhx3 tout au long du développement de l'hypophyse. À certaines étapes, il peut y avoir redondance fonctionnelle avec Lhx4, comme dans la formation de la poche de Rathke et l'expansion des lignées hormonales (Sheng et al., 1997), mais Lhx3, et pas Lhx4, semble être absolument nécessaire pour engager la poche de Rathke dans la voie de développement hypophysaire (Sheng et al., 1996). L'ablation des deux facteurs entraîne un phénotype similaire à celui de Lhx3 (Sheng et al., 1997).

Que penser des similitudes entre les ablations géniques de Lhx3 et Pitx2, d'une part, et Lhx4 et Pitx2 d'autre part? Une première possibilité, déjà abordée, est que les gènes Pitx participent avec une certaine redondance au contrôle transcriptionnel des gènes Lhx, une possibilité pour laquelle nous avons plusieurs évidences (Tremblay et al., 1998; Suh et al., 2002). Toutefois, malgré les redondances transcriptionnelles qui peuvent exister entre les membres de ces sous-familles de facteurs de transcription comme les Pitx par exemple (Tremblay et al., 2000), les différences entre les ablations géniques mentionnées ci-haut suggèrent

que Pitx2 possède une capacité d'engagement de la poche de Rathke dans la voie hypophysaire similaire à celle de Lhx3 alors que Pitx1 et Lhx4 ne l'ont pas.

Une deuxième possibilité serait que les facteurs Pitx et Lhx interagiraient pour activer la régulation transcriptionnelle de gènes-cibles requis pour le développement de la poche de Rathke. Il faudrait admettre cette fois-ci que Pitx2, mais pas Pitx1, interagirait avec Lhx3. À ce propos, Bach et al (Bach et al., 1997) ont observé que Pitx2 et Lhx3 pouvaient interagir par l'intermédiaire de cofacteurs de la famille CLIM pour activer de façon synergique la transcription du gène de l' α GSU. Non seulement les différentes étapes du développement de l'hypophyse font-elles intervenir de nombreuses molécules, mais il y a plusieurs façons dont ces molécules peuvent interagir entre elles. Ceci reflète la complexité des événements moléculaires requis pour l'induction du développement d'une glande comme l'hypophyse.

1.3.4.3 Maturation de la poche de Rathke : BMP2, GATA2 et autres marqueurs

Au jour 10,5, la poche de Rathke est sous l'influence de deux gradients dorso-ventraux, BMP4 depuis e8,5 et FGF8 depuis e9,5 qui définissent un axe moléculaire dorso-ventral. C'est à ce stade, e10,5, qu'un troisième gradient se met en place. Il s'agit d'un gradient ventro-dorsal de BMP2 exprimé dans la poche de

Rathke elle-même. Ce gradient est initié à la frontière de la poche de Rathke et de l'ectoderme oral par Shh (Treier et al., 1998; Ericson et al., 1998; Treier et al., 2001). À e12,0, BMP2 est exprimé dans toute la poche de Rathke et à e14,5, il est restreint aux cellules périluminales de l'hypophyse.

Entre ces gradients dorso-ventraux, l'hypophyse de e10,5 est divisée en compartiments qui expriment différents marqueurs moléculaires. Les facteurs de transcription à boîte homéo Nkx3.1, Six-3, Pax6 et Prop-1 étant les plus dorsaux alors que des facteurs comme Brn-4, Isl1, P-Frk et GATA2 sont exprimés dans des régions plus ventrales (Treier et al., 1998). GATA2 est un facteur de transcription particulièrement intéressant et important dans le développement hypophysaire. Son expression est activée par BMP2 (Dasen et al., 1999) et Pitx2 (Suh et al., 2002) et il a un rôle essentiel à jouer dans la différenciation des gonadotropes et des thyrotropes que nous verrons plus loin. En outre, l'expression ectopique de GATA2 peut induire celle de SF1, un facteur de transcription spécifique aux gonadotropes (Dasen et al., 1999). L'expression de ces facteurs dorsaux et ventraux sera maintenue au moins jusqu'au jour e14,5 et le rôle de la plupart d'entre eux n'est pas encore connu. Vers e11,0, la poche de Rathke se ferme et s'isole de l'ectoderme oral pour former une ébauche hypophysaire. À e12,0, une nouvelle source rostro-ventrale, qui devient ensuite ventrale, de BMP2 s'ajoute à la première avec l'expression de cette molécule dans le mésenchyme sous-jacent à l'hypophyse (Treier et al., 1998; Ericson et al., 1998).

De plus, un axe antéro-postérieur est maintenant décelable cellulièrement et moléculairement. Du côté antérieur, l'hypophyse est très rapprochée du diencéphale ventral qui produit Wnt5a. Or, comme nous l'avons décrit, Wnt5a et BMP4, qui est très similaire à BMP2, peuvent induire de façon synergique l'expression de la sous-unité hormonale α GSU. Et du côté dorsal, le mésenchyme exprime Chordine, un antagoniste des BMPs (Treier et al., 1998). Ceci concorde avec la restriction de l'expression de la sous-unité hormonale α GSU à e12,0 aux régions les plus rostro-ventrales de l'hypophyse primitive. De plus, le marqueur Msx-1, un facteur à boîte homéo qui est une cible de BMP2 et 4, est exprimé plus fortement dans la partie antérieure que dans la partie dorsale de l'hypophyse (Treier et al., 1998). Enfin, à e12,0, on note de la prolifération cellulaire mésenchymateuse dans la partie rostro-ventrale de l'hypophyse. C'est aussi dans des cellules de cette région qu'apparaît quelques heures plus tard le premier marqueur de différenciation terminale dans l'hypophyse, la POMC.

Dans le cadre de ce travail sur l'hypophyse, on dira qu'une lignée est différenciée lorsque le gène de l'hormone qui l'identifie est activé et la protéine exprimée. Par conséquent, la différenciation d'une lignée sera associée à l'analyse de la régulation transcriptionnelle du gène hormonal de cette lignée et plus particulièrement aux facteurs histo-spécifiques. Bien sûr, il faut noter ici que ces facteurs interagissent avec d'autres facteurs moins restreints comme Pitx1 et 2. Rappelons que ces facteurs d'expression restreinte dans l'organisme sont exprimés dans toute l'hypophyse. Notre laboratoire a montré qu'ils participaient à

l'activation de tous les promoteurs hormonaux hypophysaires en interagissant avec des facteurs restreints aux lignées hormonales (Tremblay et al., 1998; Poulin et al., 1997). Autrement dit, l'expression histo-spécifique des gènes hormonaux et, par conséquent, la différenciation des lignées hormonales repose en grande partie sur l'interaction d'un facteur pan-hypophysaire, Pitx1 ou Pitx2, avec des facteurs histo-spécifiques. Et c'est surtout de ces protéines ainsi que des facteurs de croissance dont nous allons maintenant traiter. On s'attardera plus aux cellules corticotropes qu'aux autres cellules de l'hypophyse puisque la lignée corticotrope est le modèle que nous avons utilisé dans le cadre de ce travail.

1.3.5 Contrôle moléculaire de la différenciation de la lignée corticotrope (ACTH)

Cette lignée est la première à se différencier chez les mammifères. Les premières cellules exprimant la POMC apparaissent dans la région rostro-ventrale de l'hypophyse à e12,5 chez la souris (Japon et al., 1994).

1.3.5.1 Rôle des facteurs de croissance

Lorsqu'on cultive des explants d'hypophyse prélevés à e10,5 jusqu'à e13, on observe l'expression de la POMC dans tout le lobe antérieur (Ericson et al.,

1998). Avec le *caveat* que le sérum du milieu de culture pourrait contenir des facteurs de croissance pro-corticotropes, ceci suggère d'une part que la différenciation des cellules corticotropes est autonome à partir du jour e10,5 et, d'autre part, qu'*in vivo* l'expression de la POMC dans la région rostro-ventrale de du lobe antérieur est le fait d'une restriction active. On peut donc se demander si la voie corticotrope est la voie de différenciation par défaut qu'il faut réprimer en partie pour permettre la différenciation des autres lignées hypophysaires. On dispose de quelques observations qui semblent aller dans ce sens. D'abord, Ericson et al (1998) ont montré que FGF8 et les BMPs restreignent la différenciation des corticotropes dans des explants prélevés à e10,5. De plus, Nudi et al (mémoire de maîtrise) ont montré l'effet répresseur de FGF8 et des BMPs sur la régulation transcriptionnelle de la POMC. À l'aide d'une démarche inverse, Treier et al (1998) ont inhibé l'action des BMPs en faisant exprimer de façon ectopique l'antagoniste Noggin sous le contrôle du promoteur de Pitx1 dans des souris transgéniques. Dans ces souris, le développement de l'hypophyse est bloqué à un stade semblable à celui d'une poche de Rathke du stade e11,0 et la POMC est le seul marqueur hormonal détecté. Ce phénotype est semblable à celui de l'ablation génique de Lhx3 (Sheng et al., 1996). Or, Lhx3 est activé par FGF8.

Il est intéressant de noter que les protéines BMPs et FGF8 qui répriment activement l'expression de la POMC sont requises pour le développement des autres lignées cellulaires (par l'intermédiaire de Lhx3 dans le cas de FGF8). Ceci veut dire que très rapidement au cours du développement les précurseurs des

cellules POMC se distinguent des précurseurs des autres lignées hypophysaires. À cet égard, les personnes dont les deux allèles *Lhx3* sont mutés reproduisent le phénotype hypophysaire murin et souffrent de déficiences hormonales combinées (Netchine et al., 2000). La seule fonction qui subsiste est la fonction corticotrope. On peut donc constater que les corticotropes, contrairement aux autres lignées hypophysaires, sont indépendantes de *Lhx3* qui est requis pour les autres lignées. Et on peut se demander de quoi leur différenciation dépend.

Le seul facteur pour lequel on a proposé un rôle positif sur la différenciation des corticotropes est la cytokine *leukemia inhibitory factor* (LIF) qui est capable de stimuler la transcription du gène de la POMC (Ray et al., 1996). L'expression ectopique de ce facteur sous le contrôle du promoteur de l' α GSU entraîne une hyperplasie de cellules exprimant la POMC aux dépens des autres lignées (Stefana et al., 1996). Malheureusement, le patron d'expression de LIF n'a pas été établi dans l'hypophyse. De plus, l'effet de l'inactivation génique du récepteur de LIF ne semble pas avoir d'effet sur les corticotropes (Kariagin et al., 2003). Donc, même si LIF a un effet clair sur la transcription de POMC, il ne semble pas en avoir sur la différenciation des cellules corticotropes.

Un candidat potentiellement plus intéressant est *Shh*, ce morphogène exprimé dans l'épithélium stomodéal mais pas dans la poche de Rathke. Lorsqu'on bloque l'activité de *Shh*, aucune lignée hormonale ne se différencie (Treier et al., 2001). Pourtant, le développement des hypophyses de souris mutantes pour *Pitx2*,

Lhx3 ou dont l'action des BMPs a été bloquée est arrêté à un stade équivalent et on y détecte cependant des cellules POMC (Treier et al., 1998; Lin et al., 1999; Suh et al., 2002; Sheng et al., 1996; Sheng et al., 1997). Shh a donc peut-être un rôle à jouer dans la différenciation des cellules corticotropes.

1.3.5.2 Dépendance du positionnement sur l'axe ventro-dorsal

Un rôle important de Shh sur la différenciation des corticotropes pourrait être indirect, il s'agirait d'un rôle ventralisant dans le développement de la poche de Rathke. En effet, la différenciation des corticotropes semble être très sensible à l'intensité des gradients moléculaires ventralisants et dorsalisants. Les corticotropes apparaissent dans la région de l'hypophyse qui subit le moins l'influence de ces gradients, que ce soient les facteurs de croissance dorsalisant BMP4 et FGF8 ou le facteur ventralisant BMP2 qui bloquent l'apparition de ces cellules. De plus, les cellules POMC apparaissent dans une région où l'expression d'Isl1, un marqueur très ventral activé et/ou maintenu par les BMPs, doit être préalablement réprimée (Ericson et al., 1998). Une autre observation semble aller dans le même sens. Il s'agit du fait que la double inactivation génique de deux facteurs de transcription dorsalisants, Prop-1 (à qui une section ultérieure est consacrée) et Lhx4, bloque l'apparition des cellules POMC (Raetzman et al., 2002) et que quelques unes seulement apparaissent après la naissance. L'inactivation de ces deux facteurs, mais pas de chaque facteur individuellement, semble

déstabiliser les gradients dorsaux au point où il se produirait une sur-ventralisation de l'ébauche hypophysaire, telle qu'indiquée par une forte dorsalisation de l'expression du marqueur ventral *Isl1* (Raetzman et al., 2002). Les cellules de l'hypophyse seraient donc toutes soumises soit à une influence dorsale forte à cause des FGFs et des BMPs, soit à une influence ventrale forte par BMP2. Et il n'y aurait plus d'endroit où des cellules échappant à ces influences inhibitrices pourraient se différencier en corticotropes.

1.3.5.2 Un mécanisme d'exclusion latérale?

L'action dorsalisante de Prop-1, qui s'oppose à la différenciation des corticotropes, pourrait provenir du fait qu'il est requis, bien que non suffisant, pour l'expression de *Notch2* dans l'hypophyse (Raetzman et al., 2004). Or les protéines Notch répriment l'expression de la POMC (Souaze et al, 2004). Ces protéines sont des récepteurs membranaires qui peuvent interagir avec des ligands membranaires de la famille Delta présents sur d'autres cellules. Suite à l'interaction de Delta avec Notch, le domaine intracellulaire de cette dernière est clivé et induit une voie de signalisation menant à la régulation transcriptionnelle de gènes-cibles, incluant la répression de Delta au sein de ces cellules. Cette interaction Delta - Notch est au cœur d'un processus appelé exclusion latérale qui est important pour de nombreuses voies de différenciation (voir Gaiano et Fishell [2002] pour une revue dans le système nerveux de vertébrés). Ce processus commence dans une

population homogène de cellules en contact les unes avec les autres qui envoient autant de signaux Delta qu'elles en reçoivent et qui sont donc toutes sous un certain niveau de répression par Notch. Lorsque certaines cellules se mettent à exprimer de plus hauts niveaux de ligands Delta, elles activent plus fortement la voie de signalisation Notch des cellules voisines. Ceci a pour conséquence de renforcer la répression par Notch dans ces cellules, en particulier celle des gènes de différenciation et Delta. Non seulement ces cellules sont maintenant écartées de la voie de différenciation, mais elles ne peuvent maintenant plus réprimer par la voie Delta-Notch l'expression des gènes de différenciation des premières puisque leur gène *Delta* est fortement réprimé. Celles-ci peuvent désormais se différencier en plus d'exprimer des niveaux encore plus élevés de Delta. Ce qui renforce la différence entre les destinées cellulaires des deux populations.

Notch2 et Delta-like 3 (Dll3) sont exprimés dans l'hypophyse embryonnaire (Raetzman et al., 2004). L'expression de Dll3 est restreinte aux cellules POMC (corticotropes et mélanotropes) au moins à partir de e13,5 et Notch peut réprimer la transcription de la POMC. L'apparition des corticotropes pourrait donc se produire dans un contexte d'exclusion latérale. Raetzman et al n'ont pas vu d'effet sur le nombre de corticotropes dans les hypophyses Dll3 $-/-$, mais cela pourrait être le fait d'une redondance fonctionnelle avec Delta-like 1 (Dll1) qui est aussi exprimé dans l'hypophyse. L'inactivation génique de Notch2 a été réalisée mais les auteurs sont muets sur les effets hypophysaires (Hamada et al., 1999; McCright et al., 2002).

1.3.5.3 Rôle des activateurs transcriptionnels histospécifiques de la POMC

Une autre approche pour identifier les agents de différenciation corticotropes est d'analyser la régulation histospécifique du gène de la POMC. C'est ainsi que le facteur de transcription à domaine bHLH NeuroD1 (BETA2) a été identifié comme transactivateur du gène (Poulin et al., 1997; Poulin et al., 2000). NeuroD1 est exprimé à partir du jour e12,0 dans les cellules pré-corticotropes et active la transcription de POMC en interagissant de façon synergique avec le facteur Pitx1. À partir du jour e15,0, l'ARNm de NeuroD1 n'est plus traduit même si le gène est encore exprimé. Par ailleurs, l'ablation génique de NeuroD1 n'a pas d'effet visible sur l'hypophyse adulte (Poulin, non publié).

1.3.6 Lignées dépendantes de Pit1(GHF1) (somatotropes, lactotropes, thyrotropes)

Pit1 est un facteur de transcription à boîte homéo de la sous-famille POU. Il a été identifié comme un régulateur transcriptionnel des gènes de l'hormone de croissance et de la prolactine (Bodner and Karin, 1987; Bodner et al., 1988; Ingraham et al., 1988). De plus, l'analyse des souris mutantes naines *Snell* et *Jackson*, qui n'ont pas de lactotropes, ni de somatotropes, ni de thyrotropes, a montré que ce phénotype était associé à des mutations dans le gène Pit1, d'où la

dénomination de lignées dépendantes de Pit1 (Camper et al., 1990; Li et al., 1990). Notons qu'au cours du développement hypophysaire, il apparaît temporairement une population de cellules thyrotropes qui n'expriment pas Pit1 et qui sont localisées principalement dans la pointe rostrale de l'hypophyse. L'importance de cette population transitoire n'est pas bien définie.

1.3.6.1 Prop-1

Une autre souris mutante naine, *Ames*, présente un phénotype semblable à celui causé par une délétion de Pit1. L'analyse de cette mutation par clonage positionnel a permis d'identifier une autre protéine à boîte homéo de la famille Paired, qui agit en amont de Pit1, Prophet of Pit ou Prop-1 (Sornson et al., 1996).

Prop-1 est apparaît dans la poche de Rathke au jour e10,5 et est exprimé au cours du développement hypophysaire jusqu'au jour e16,5 (Sornson et al., 1996). Dans les souris *Ames*, la poche de Rathke est plus grande et déformée, comme si les cellules qui prolifèrent de façon mésenchymateuse pour former le lobe antérieur vers e12,0, restaient à l'état épithélial.

Ajoutons que des mutations qui bloquent totalement la liaison à l'ADN de la protéine produite par le gène humain *PROP-1* peuvent parfois entraîner des déficiences en ACTH et en gonadotropines (Pernasetti et al., 2000; Asteria et al.,

2000). Cette observation peut être mise en rapport avec le rôle général dorsalisant que Prop-1 peut jouer dans la différenciation de cellules qui ne l'expriment pas comme les corticotropes. Prop-1 a un rôle général à jouer dans le développement de l'hypophyse tout en étant absolument requis pour l'activation de Pit1 et la différenciation des lignées dépendantes de Pit1.

Par ailleurs, dans les souris déficientes en Prop-1, la fenêtre temporelle d'expression de Rpx, un homéofacteur qui semble avoir un rôle prolifératif dans le développement précoce de l'hypophyse (voir section 1.3.4.1.1), est prolongée au delà du jour e14,0 où elle s'éteint habituellement (Gage et al., 1996; Sornson et al., 1996). Rpx est capable d'hétérodimériser avec Prop-1, ce qui a pour effet de bloquer l'activité de Prop-1 (Sornson et al., 1996). Donc, l'interaction entre Rpx et Prop-1 pourrait participer au contrôle de l'ajustement prolifération / différenciation au cours du développement hypophysaire. Dans les faits, on remarque que le marqueur de détermination Pit1 est activé par Prop-1 au jour e13,5 lorsque Rpx cesse d'être exprimé et d'inhiber l'activité de Prop1.

1.3.6.2 Pit1

Pit1 active la transcription des gènes TSH, GH et PRL en synergie avec Pitx1 et 2 (Tremblay et al., 1998; Tremblay et al., 2000) et en interagissant avec

d'autres partenaires transcriptionnels d'expression restreinte. Ce sont ces partenaires que je vais mentionner maintenant.

1.3.6.3 Somatotropes (GH)

Dans ces cellules, Pit1 interagit avec les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur à l'hormone thyroïdienne pour activer la synthèse de GH (Palomino et al., 1998). L'ablation génique du récepteur à l'hormone thyroïdienne entraîne une baisse de l'expression de la GH ainsi que du nombre de cellules somatotropes (Gothe et al., 1999).

1.3.6.4 Lactotropes (PRL)

Dans la régulation transcriptionnelle de PRL, Pit1 interagit avec le récepteur aux oestrogènes (Simmons et al., 1990). L'ablation génique de ce récepteur cause une diminution de l'expression de PRL et du nombre de lactotropes (Scully et al., 1997). Un autre partenaire de la régulation transcriptionnelle de la PRL est le facteur à domaine ETS, Ets-1. (Bradford et al., 1995; Bradford et al., 1997).

1.3.6.5 Thyrotropes (TSH)

Dans ces cellules, un partenaire essentiel de Pit1 est le facteur à doigt de zinc de la famille GATA, GATA2. Dans l'hypophyse, ce facteur est une cible de BMP2 (Dasen et al., 1999) et de Pitx2 (Suh et al., 2002). Il interagit physiquement avec Pit1. Leurs sites de liaison respectifs sur le promoteur de TSH sont adjacents l'un de l'autre (Dasen et al., 1999).

L'interaction entre Pit1 et GATA2 est essentielle pour l'expression spécifique de TSH dans les thyrotropes par rapport aux gènes des cellules gonadotropes qui dépendent elles aussi de GATA2 (Dasen et al., 1999). Cette interaction permet aux deux facteurs de lier l'ADN ensemble. Toutefois, si un des deux ne peut pas lier l'ADN, il se comporte alors comme un négatif dominant et il empêche alors l'autre de lier sa cible sur l'ADN. Ainsi, dans les thyrotropes, GATA2 et Pit1 peuvent activer le promoteur TSH qui contient un site GATA2 et deux sites Pit1 mais il n'y a pas d'activation du promoteur du marqueur gonadotrope SF1 puisqu'il ne contient qu'un seul site GATA et pas de site pour Pit1. Dans le cas où une mutation dans Pit1 détruit l'interaction avec GATA2, les gènes thyrotropes ne sont plus activés, les gènes gonadotropes ne sont plus réprimés et les cellules thyrotropes prennent un destin gonadotrope (Dasen and Rosenfeld, 2001).

1.3.7 Lignée gonadotrope (LH et FSH)

Les cellules gonadotropes expriment beaucoup de facteurs en commun avec les thyrotropes. Il faut donc, de façon réciproque à ce qui se passe dans ces dernières cellules, activer les gènes gonado-spécifiques et réprimer TSH. Le facteur GATA2 est encore impliqué dans ce mécanisme. Tout d'abord, il est exprimé à des niveaux plus élevé, ce qui a pour conséquence de réprimer l'expression de Pit1 (Dasen et al., 1999). En absence de Pit1 pour interagir avec GATA2, comme précédemment, les gènes thyrotropes ne sont pas activés et les gènes gonadotropes sont activés. De fait, si on fait exprimer de hauts niveaux de GATA2 de façon ectopique sous le contrôle du promoteur Pit1 dans des souris transgéniques, on inhibe l'expression de Pit1 dans les futures thyrotropes qui deviennent alors des gonadotropes (Dasen et al., 1999).

Un autre facteur de transcription essentiel au développement des gonadotropes est le récepteur nucléaire SF1. Son expression dans l'hypophyse commence à e13,5 (Ingraham et al., 1994). Lorsque SF1 est inactivé dans l'hypophyse, il y a hypoplasie des gonadotropes et blocage de la synthèse hormonale gonadotrope (Zhao et al., 2001).

Les cellules gonadotropes expriment la LH et la FSH, mais la régulation de ces hormones est différente. Par exemple, sur le promoteur de la LH β , le facteur à doigt de zinc Egr, qui est induit rapidement en réponse à l'hormone de relâchement

des gonadotropines (GnRH), et le récepteur nucléaire SF1 participent à la régulation transcriptionnelle en interagissant avec Pitx1 (Tremblay et al., 1998; Tremblay et al., 1999; Tremblay and Drouin, 1999). L'ablation génique de Egr entraîne une baisse de l'expression de la LH mais pas de la FSH (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1998).

1.3.8 Lignée mélanotrope (α -MSH)

Cette lignée est apparemment la seule présente dans le lobe intermédiaire et peu de choses sont connues sur les mécanismes transcriptionnels histospécifiques de ces cellules. Tout au plus a-t-il été observé que l'ablation génique de GR entraîne une forte baisse de l'expression de POMC dans ces cellules (Reichardt and Schutz, 1996). Ce qui est par ailleurs intéressant puisque dans l'autre lignée exprimant la POMC, les corticotropes, le GR est impliqué dans la régulation négative de la transcription de la POMC, comme nous le verrons plus loin.

On dispose de peu d'informations sur l'origine de cette lignée. Toutefois, lorsqu'on suit la différenciation de cette lignée par l'apparition de la POMC, on constate que la protéine POMC apparaît d'abord dans la région caudo-ventrale en contact avec le lobe antérieur. Ensuite, les cellules du lobe intermédiaire se mettent à exprimer la POMC de façon linéaire dans l'axe caudo-ventral / antéro-dorsal (observation personnelle et d'autres au laboratoire). Comme si les cellules POMC

elles-mêmes induisaient les suivantes dans l'axe caudo-ventral / antéro-dorsal à exprimer la POMC. Une autre interprétation de cette observation serait des mécanismes de prolifération/migration/différenciation à partir de la région caudo-ventrale et de mort cellulaire à l'extrémité antéro-dorsale. Quelle que soit l'interprétation qu'on en fait, il semblerait que l'induction de la différenciation des mélanotropes se produise dans la région caudale de l'hypophyse à la frontière du lobe antérieur. Y aurait-il dans cette région des cellules POMC+ indépendantes de NeuroD1 (qui marque les corticotropes mais pas les mélanotropes) tout comme il existe des thyrotropes indépendantes de Pit1? Ou bien les mélanotropes dérivent-elles des corticotropes? En effet, d'un point de vue de production hormonale uniquement, les mélanotropes sont des corticotropes où le processus de maturation de la POMC est poussé une étape plus loin grâce à la pro-convertase PC2. Et la différenciation des mélanotropes commence justement au moment du développement où la traduction de NeuroD1 cesse. Ou alors, les mélanotropes se différencient-elles indépendamment à partir de cellules souches hypophysaires?

Une observation à l'encontre de cette possibilité est que, comme les corticotropes, les mélanotropes expriment Dll3 au moment de leur différenciation (Raetzman et al., 2004). Ces deux lignées sont les seules à exprimer Dll3, ce qui supporte la possibilité d'un lien entre elles. À cet égard, on peut noter que Notch2 est exprimé à de très bas niveaux dans le lobe intermédiaire. Ceci suggère qu'il n'y aurait pas de mécanisme d'exclusion latérale dans le lobe intermédiaire qui est histologiquement uniforme alors qu'il pourrait y en avoir un, comme je l'ai

mentionné, dans le lobe antérieur qui contient quatre types cellulaires producteurs d'hormones qui se différencient après les corticotropes.

1.3.9 Synthèse des étapes moléculaires de la différenciation des lignées hypophysaires

Il s'agit ici de décrire le modèle de développement et différenciation hypophysaires que j'ai élaboré à partir des résultats et observations mentionnés tout au long de cette section sur le développement de l'hypophyse. Je présente le patron de différenciation chronologique de ce modèle selon l'axe dorso-ventral à la figure 1.4.

À e8,5, l'ectoderme oral exprime déjà Shh ainsi que Pitx1 et 2 qui définissent le segment stomodeal. L'invagination de la poche de Rathke commence vers e9,0 probablement sous l'effet de BMP4 exprimé dans l'infundibulum. BMP4 participe à l'expression de Isl1 et réprime Shh dans la poche de Rathke. Au jour e9,5, suite à l'induction de FGF8/10 dans l'infundibulum par T/ebp, un gradient dorso-ventral de Lhx3 se met en place dans la poche de Rathke et l'expression de Isl1 est restreinte à la région la plus ventrale. Ceci divise les cellules en celles dont la différenciation dépend de Lhx3 et les autres, les plus ventrales, dont la différenciation ne dépend pas de Lhx3.

Lignées dépendantes de Lhx3 : Vers e10,0, probablement sous l'induction de Shh, il apparaît un gradient ventro-dorsal de BMP2 dans la poche de Rathke qui génère à son tour un gradient ventro-dorsal de GATA2. À ce stade, l'expression de Prop-1 est détectée dans la région dorsale de la poche de Rathke. Un jour plus tard, à e11,5, cette expression s'est étendue ventralement. Les cellules de l'ébauche hypophysaire sont donc divisées en trois régions déterminées par les gradients opposés de Prop-1 et GATA2 : les cellules dorsales expriment plus fortement Prop-1, les médianes Prop-1 et GATA2 et les ventrales surtout GATA2.

Les cellules dorsales donneront naissance aux somatotropes et aux lactotropes et les cellules médianes aux thyrotropes. Dans les plus ventrales, l'expression plus forte de GATA2 réprime celle de Pit1, là où celui-ci est exprimé, et active possiblement celle de SF1 au jour e13,5, ce qui engage ces cellules dans la voie gonadotrope.

Lignées indépendantes de Lhx3 : Les cellules ventrales indépendantes de Lhx3 se divisent en deux régions selon l'axe antéro-postérieur, la pointe rostrale et le lobe antérieur. L'expression de BMP2 dans la poche de Rathke s'éteint progressivement pour être remplacée vers le jour e11,0 par une source rostro-ventrale d'expression de BMP2 qui affectent surtout les cellules de la pointe rostrale qui expriment alors GATA2, Isl1 et α -GSU. Ces cellules exprimeront temporairement la TSH. Il s'agit donc d'une population transitoire de thyrotropes indépendantes de Pit1. Je les ai placées parmi les cellules

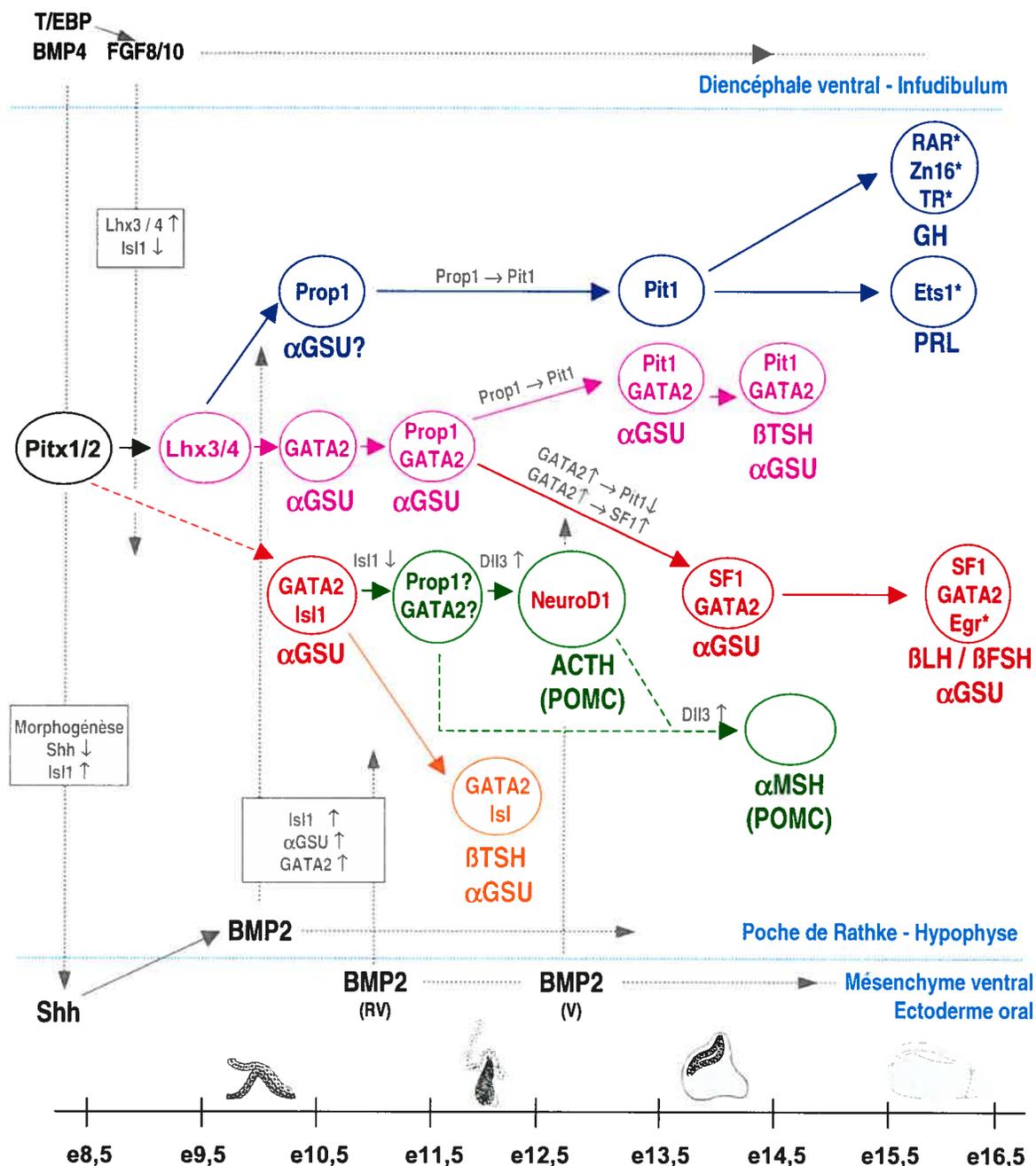


Figure 1.4 : Différenciation des lignées hormonales hypophysaires. La différenciation des lignées est indiquée dans le temps et dans l'axe dorso-ventral. Les flèches grises horizontales indiquent la durée de l'expression des facteurs de croissance dans le temps. La hauteur des flèches grises verticales indique la région et les lignées influencées par le facteur de croissance. L'effet est mentionné dans une boîte grise. * indique que le facteur de transcription contribue à l'histo-spécificité chez l'adulte, mais le moment de l'initiation de l'expression n'est pas connu. Noter le passage de la source de BMP2 d'une position rostro-ventrale (RV) à ventrale (V).

indépendantes de *Lhx3* même si on ne dispose pas de données sur l'expression de TSH dans les souris *Lhx3*^{-/-} au stade où les thyrotropes indépendantes de *Pit1* sont exprimées. Cependant, l'expression d' α GSU et *Isl1* qui les caractérise est restreinte par FGF8 qui est aussi un activateur de *Lhx3*. Ce sont aussi des cellules ventrales et les premières corticotropes semblent se différencier suite à une répression de *Isl1* dans les plus caudales d'entre elles (Ericson et al., 1998).

Les cellules de la pointe rostrale servent d'écran aux cellules ventrales du lobe antérieur face à BMP2. Ces cellules, protégées par leur position des influences fortes des facteurs de croissance BMP et FGF, s'engagent dans la voie corticotrope, possiblement par exclusion latérale. Cet engagement est solidement déterminé pour que les cellules restent engagées même lorsque, après e12,5, elles sont soumises à BMP2 exprimé désormais d'une source ventrale, juste sous l'hypophyse, et que SF1 est induit dans la partie ventrale de l'hypophyse. Enfin, les mélanotropes proviendraient de corticotropes dont l'expression de *NeuroD1* est éteinte ou de précurseurs communs avec les corticotropes.

1.4 Physiologie de l'ACTH et des autres peptides dérivés de la POMC et régulation hormonale de la POMC

Les mélano-stimulines sont les premiers peptides dérivés de la POMC à avoir été identifiés pour leur rôle dans le contrôle de la pigmentation de la peau

chez la grenouille (Smith, 1916). On compte sept polypeptides dérivés de la POMC. Ils sont produits par modifications post-traductionnelles à l'aide de proconvertases qui la coupent en plus petits peptides actifs. Le premier clivage de la POMC génère l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), un fragment N-terminal ainsi qu'un fragment C-terminal (β -lipotropin). Le peptide ACTH peut être par la suite coupé en mélanostimulines α (α -MSH) dans les cellules mélanotropes, comme il a déjà été mentionné, l'autre produit du clivage étant le peptide pseudo-corticotropique du lobe intermédiaire (CLIP). Le fragment N-terminal peut lui-même être clivé en γ -MSH et le fragment C-terminal peut être coupé en β -MSH et en β -endorphine. La POMC est exprimée dans plusieurs organes, dont l'intestin, le placenta et le pancréas, mais les sites majeurs d'expression sont l'hypophyse et l'hypothalamus. L'hypophyse est le site de production de l'ACTH (et un site de production d' α -MSH qui agira au niveau de la peau chez certains organismes) et certains neurones des noyaux arqués de l'hypothalamus produisent de l' α -MSH qui agit comme neurotransmetteur dans le contrôle de l'appétit.

1.4.1 Stress, ACTH et axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien

Dans une situation stressante, mentalement ou physiquement (froid, douleur etc.), l'hypothalamus libère dans le système sanguin porte de l'hypophyse l'hormone de relâchement corticotropique (CRH) qui est rapidement délivrée dans

le lobe antérieur de l'hypophyse (Fig 1.5A). La CRH active la transcription du gène de la POMC et la production d'ACTH ainsi que la sécrétion de l'ACTH contenu en réserve dans des granules cytoplasmiques dans le système circulatoire sanguin. Les organes-cibles de l'ACTH sont les glandes surrénales dont le cortex produit et sécrète des glucocorticoïdes en réponse à l'ACTH. Ces glucocorticoïdes, dont le principal est le cortisol, modifient le métabolisme glucidique, protéique et lipidique pour préparer l'organisme à faire face à ce stress. Un effet net de l'action des glucocorticoïdes est l'augmentation du glucose sanguin. Une fois que la situation stressante a été gérée, la stimulation hypothalamique cesse et les niveaux d'ACTH et de glucocorticoïdes diminuent. Il existe aussi une boucle de rétroaction négative des glucocorticoïdes qui bloquent la synthèse de la CRH au niveau de l'hypothalamus et celle de la POMC au niveau de l'hypophyse (Guyton, 1990).

1.4.2 Régulation transcriptionnelle du gène de la POMC des cellules corticotropes dans le contexte de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien

La CRH se lie à un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G sur la membrane des cellules corticotropes. Suivant le modèle classique, les protéines activées activent à leur tour une adénylate cyclase membranaire qui convertit alors l'ATP en un second messenger, l'AMP cyclique (Fig 1.5B). La conséquence de l'augmentation de l'AMPc est l'activation

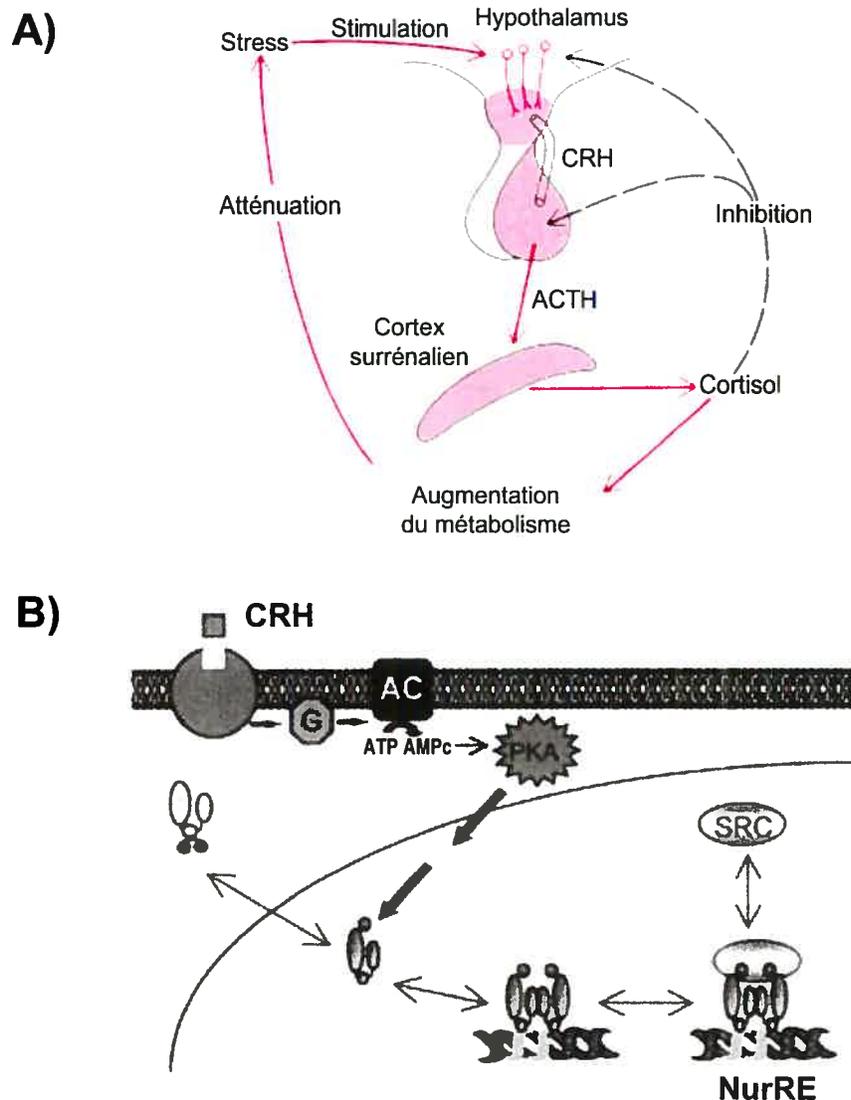


Figure 1.5 : Axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. A) Boucle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. L'hypothalamus intègre un signal de stress et sécrète de la CRH dans le système circulatoire porte de l'hypophyse. En réponse, l'hypophyse libère de l'ACTH dans la circulation générale. Cet ACTH stimule les glandes surrénaliennes à produire du cortisol qui prépare la réponse métabolique au stress. De plus, ce cortisol ira aussi inhiber la synthèse et le relâchement de la CRH et de l'ACTH. Adapté de Guyton (1990). B) Voie de signalisation de la CRH dans les corticotropes. Suite à la liaison du ligand, PKA est activée et des modifications de l'état de phosphorylation de Nur77 vont permettre sa dimérisation. Ce dimère peut lier l'élément NurRE du promoteur de la POMC et interagir avec des co-facteurs pour activer sa transcription. Adapté de Maira (2003)

de la protéine kinase A (PKA) et l'augmentation de Ca^{++} intracellulaire qui peut moduler l'activité de la PKA suite à l'ouverture de canaux calciques. Une cible de la PKA est un des trois membres de la famille des récepteurs nucléaires orphelins Nur, Nur77 (NGFI-B). D'une part, la déphosphorylation du domaine de liaison à l'ADN de Nur77 favorise son homodimérisation et la liaison de ce dimère à son élément de réponse sur le promoteur de la POMC, l'élément NurRE. D'autre part, PKA active le domaine activateur de la transcription (AF-1), possiblement par phosphorylation. Ce qui a pour effet de recruter des co-activateurs du type des SRC de la famille p160 qui interagissent à leur tour avec l'intégrateur transcriptionnel CBP/p300 pour augmenter la transcription de la POMC (Fig 5B) (Maira et al., 1999; Maira et al., 2003b).

L'effet de la CRH sur la transcription de la POMC peut être augmenté synergiquement en présence de la cytokine LIF. LIF activerait la voie JAK/STAT dans les cellules corticotropes (Ray et al., 1996).

La répression par les glucocorticoïdes peut se produire de façon directe lorsque les récepteurs aux glucocorticoïdes additionnés de leur ligand se lient à un élément nGRE pour réprimer la transcription (Drouin et al., 1993). Cependant, une autre façon de réprimer l'activation de la transcription par la CRH est d'interférer avec la voie de signalisation intracellulaire de la CRH soit en diminuant la synthèse de Nur77 et en antagonisant la fonction de Nur77 par interaction

physique directe ou sur un co-activateur de Nur77 (Philips et al., 1997) (Martens et al., 2004).

1.4.3 Rôle de l' α -MSH dans le contrôle de l'appétit et la pigmentation

Chez les mammifères, l'excédent calorique ingéré est mis en réserve sous forme de lipide dans les adipocytes et ces adipocytes participent au contrôle du poids corporel en produisant la leptine, une hormone qui exerce une rétroaction négative sur l'appétit pour réduire l'apport calorique. La leptine induit la production d' α -MSH dans les neurones POMC des noyaux arqués de l'hypothalamus. Et cet α -MSH qui est le messenger qui ira produire la sensation de satiété chez le sujet en agissant sur les neurones concernés ailleurs dans l'hypothalamus. Pour ce faire, l' α -MSH doit se lier à son récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G hypothalamique spécifique MC4R (pour un article de synthèse sur ce sujet voir MacNeil et al. [2002]). Donc l'importance de l' α -MSH dans l'obésité peut être caractérisée spécifiquement par l'étude de son récepteur. Et de fait, perturber l'activité de ce récepteur (Lu et al., 1994; Fan et al., 1997) ou l'inactiver génétiquement (Huszar et al., 1997) entraîne une obésité chez la souris. Et de nombreux cas d'obésité chez l'humain ont été associés à des mutations dans le gène codant pour MC4R (Kobayashi et al., 2002; del Giudice et al., 2002; Dubern et al., 2001; Rosmond et al., 2001).

L' α -MSH peut modifier la pigmentation de la peau et du poil en stimulant la production de mélanine par les mélanocytes de la peau en liant un récepteur aux mélanocortines MC1R (Valverde et al., 1995). Il ne s'agit cependant pas d' α -MSH produite par les neurones hypothalamiques. Chez les rongeurs et certains vertébrés dits inférieurs, cette α -MSH est produite par les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire de l'hypophyse. Chez l'humain, le lobe intermédiaire régresse vers la seizième semaine de la grossesse et ne peut être responsable de la production d' α -MSH. Il a été proposé que, chez l'humain, cette production a lieu au niveau de la peau. Quoiqu'il en soit, il n'y a qu'un seul type de cellules hypophysaires exprimant significativement la POMC chez l'humain, contrairement à la souris où il existe les corticotropes et les mélanotropes.

1.4.4 Causes et conséquences d'une déficience en POMC

Comme la POMC génère plusieurs peptides qui ont des effets physiologiques différents, une déficience en POMC aura des effets pléiotropiques où chaque symptôme sera associé au manque d'un de ces peptides en particulier, ce qui revient à dire que chaque symptôme est associé à un site d'expression en particulier de la POMC (Tableau I-1). Des sections précédentes, on peut supposer que le manque d' α -MSH, comme pour l'inactivation de son récepteur MC4R dans l'hypothalamus, aura pour conséquence de provoquer l'obésité tandis qu'un manque d'ACTH entraînera un déficit de production de glucocorticoïdes. De plus,

Tableau I-1 : Relations entre les symptômes causés par une déficience humaine liée à la POMC et les sites d'expression de la POMC

Site d'expression	Phénotype	Gène muté en rapport avec les symptômes		
		POMC	MC4R	?
Hypothalamus	→ Obésité	✓	✓	
Hypophyse	→ Insuffisance surrénalienne	✓		✓
Peau	→ Rousseur	✓		

étant donné le rôle de l' α -MSH sur les mélanocytes, on peut aussi s'attendre à des problèmes de pigmentation. Les déficiences en POMC sont souvent associées à d'autres déficiences hormonales et résultent d'un problème hypophysaire plus général (Cohen and Radovick, 2002; Vallette-Kasic et al., 2003; Jackson et al., 1997). Dans le cas de mutations qui affectent uniquement le gène de la POMC chez l'humain, on observe, comme prévu, de très bas niveaux de glucocorticoïdes, une obésité et une pilosité rousse (Krude et al., 1998; Krude and Gruters, 2000).

Des déficiences en ACTH uniquement, et pas en d'autres peptides dérivés de la POMC, sont rares mais certaines ont été rapportées (Malpuech et al., 1988; Soo et al., 1994; Kylo et al., 1996). Comme on pouvait s'y attendre, les niveaux de glucocorticoïdes sont très faibles chez ces patients, mais il n'y a pas de rousseur, ni d'obésité associée. Par contre, bien qu'un traitement de supplémentation efficace soit disponible, cette condition peut être mortelle pour le nouveau-né si elle n'est pas traitée rapidement. Et étant donné la difficulté à identifier cette déficience à la naissance, il est fort probable qu'elle est responsable de plusieurs décès inexpliqués.

Cette spécificité suggère que l'origine de cette déficience remonte aux cellules corticotropes. De fait, l'ablation génique du récepteur à la CRH chez les souris cause ce genre de phénotype (Timpl et al., 1998; Smith et al., 1998) et Kylo et al (1996) ont proposé que l'inactivation de la CRH et/ou de son récepteur soit responsable de déficiences en ACTH chez l'humain. Cependant, aucune mutation

de ce type n'a été rapportée. Des mutations de la pro-convertase 1 (qui clive la POMC en ACTH) sont aussi à exclure pour expliquer une déficience isolée en ACTH puisque, comme la PC1 est utilisée dans d'autres cellules, son inactivation entraîne des déficiences multiples (Jackson et al., 1997). Il reste la possibilité qu'une déficience spécifique en ACTH soit le résultat d'un trouble de l'activation transcriptionnelle spécifique du gène de la POMC dans l'hypophyse. NeuroD1 est un activateur spécifique de la POMC dans l'hypophyse, mais son expression temporaire en fait un mauvais candidat. De plus, la POMC est exprimée à la naissance malgré l'inactivation génique de *NeuroD1* (Liu et al., 2001). Donc, bien qu'un problème transcriptionnel spécifique aux cellules corticotropes soit une bonne piste pour trouver la source des déficiences spécifiques en ACTH, nous ne disposons pas encore de protéines candidates qui participeraient à l'activation histo-spécifique du gène de la POMC dans les corticotropes.

1.5 Régulation histospécifique de la POMC dans les cellules corticotropes

L'étude de l'activation spécifique du gène de la POMC dans les cellules corticotropes a été entreprise au début des années 90. L'analyse de mutants de délétion des régions en 5' de la partie codante du gène a montré que 480 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription suffisaient pour récapituler l'expression du gène et que ce promoteur pouvait être découpé en trois régions,

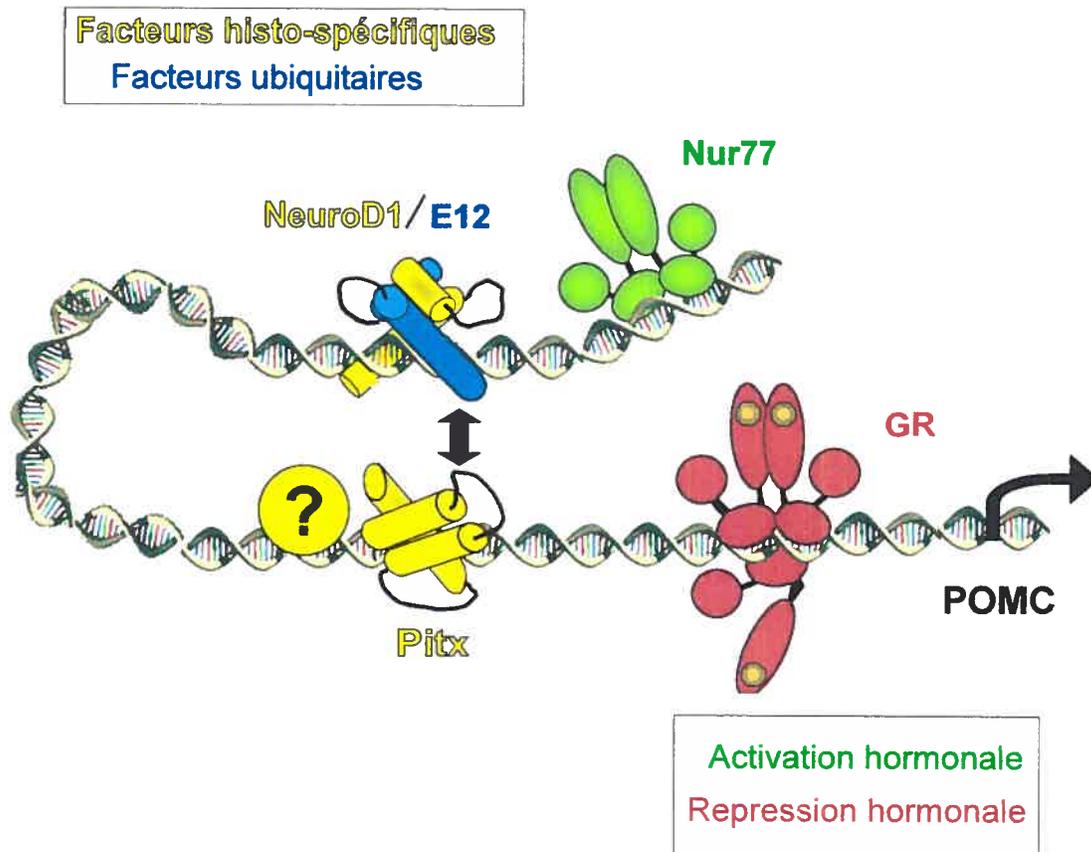


Figure 1.6 : Régulation transcriptionnelle de la POMC. Les facteurs de transcription histo-spécifiques et ceux de la régulation hormonale sont placés relativement les uns par rapport aux autres sur le promoteur de la POMC. Les interactions physiques entre les facteurs sont indiqués par une flèche noire.

proximale, centrale et distale, en fonction de leur activité régulatrice (Jeannotte et al., 1987). Une analyse fine avec des mutations introduites tout au long du promoteur a permis d'identifier des éléments importants pour l'activation transcriptionnelle du promoteur et pour l'histo-spécificité de cette activation, en particulier un élément en position distale identifié CUTE pour *Corticotrope Upstream Transcription Element* (Therrien and Drouin, 1991; Therrien and Drouin, 1993). Des transfections de différentes combinaisons des éléments importants pour la transcription du gène et/ou des grandes régions du promoteurs a permis d'identifier un autre élément dans la région centrale, CE3, qui pouvait augmenter de façon synergique l'activité spécifique de CUTE (Lamonerie et al., 1996). La recherche des facteurs agissant par ces éléments a mené, d'une part, à l'identification du facteur basique-hélice-boucle (*loop*)-hélice NeuroD1 qui lie CUTE après avoir dimérisé avec un autre facteur bHLH ubiquitaire comme Pan1 (E47) (Poulin et al., 1997; Poulin et al., 2000) et, d'autre part, au clonage du facteur à boîte homéo Pitx1 qui lie l'élément CE3 (Lamonerie et al., 1996). De plus, il a été montré que l'interaction synergique entre CUTE et CE3 passait par une interaction physique et fonctionnelle entre l'homéodomaine de Pitx1 et le domaine bHLH de Pan1 au sein de l'hétérodimère NeuroD1 / Pan1 (Poulin et al., 2000) (Fig 1.6). Le rôle de NeuroD1 semble être d'assurer une liaison spécifique de l'hétérodimère sur sa cible CUTE dans le promoteur.

L'élément CE3 possède à lui seul une capacité de transactivation faible mais histo-spécifique (Lamonerie et al., 1996). Or, nous avons déjà décrit que

Pitx1 est exprimé dans toutes les cellules de l'hypophyse (Lanctôt et al., 1997; Lanctôt et al., 1999a). Donc Pitx1 ne pouvait être responsable de l'histo-spécificité de l'élément CE3. Une analyse mutationnelle a permis d'identifier un deuxième élément important pour la transcription à côté de celui de Pitx1 au sein de l'élément CE3. Cet élément est semblable à la séquence consensus liée par les facteurs à boîte T. La majeure partie de mon projet de thèse a été d'identifier et de caractériser le facteur à boîte T qui lie le CE3 (voir chapitre 2).

Puisque la régulation histo-spécifique de la POMC requiert un ensemble de facteurs de transcription dont un membre de la famille des homéoprotéines, Pitx1, un hétérodimère de facteurs à domaine bHLH, NeuroD1/Pan1, et un facteur de transcription liant un élément T, je vais maintenant effectuer une brève description de ces familles.

1.6 Facteurs de transcription à boîte homéo

Les facteurs de transcription à boîte homéo sont identifiés par un domaine de liaison à l'ADN de soixante acides aminés qui forment une structure très bien conservée malgré les divergences de séquences qui existent entre les homéodomains de différentes espèces.

1.6.1 Structure et liaison à l'ADN

Les analyses cristallographiques ont montré que l'homéodomaine est essentiellement structuré autour d'un motif général HTH (*helix-turn-helix*) qui prend la forme d'une séquence secondaire bras - hélice α - boucle - hélice α - tour (*turn*) – hélice (Hirsch and Aggarwal, 1995; Wolberger et al., 1991; Kissinger et al., 1990). Les deux premières hélices (aa10-22 et 28-37) sont en position anti-parallèles et reliées par une boucle de longueur bien conservée. La troisième hélice (42-58) est perpendiculaire aux deux premières et est en contact avec elles sur une face. L'autre face de la troisième hélice s'insère dans le sillon majeur de l'ADN et est responsable de la liaison à une séquence consensus TAATNN d'où son nom d'hélice de reconnaissance. Les nucléotides NN sont en contact avec l'acide aminé en position 9 de la troisième hélice (ou 50 de l'homéodomaine). Et c'est cet acide aminé qui contribue à déterminer la séquence que l'homéodomaine pourra lier. Par exemple, un homéodomaine avec une lysine en position 50 liera plus facilement une séquence TAATCC alors qu'un homéodomaine avec une glutamine en position 50 liera plutôt une séquence TAATGG (Gehring et al., 1994). Cependant, la majorité des contacts avec l'ADN se fait avec les phosphates de façon peu spécifique. Le bras en N-terminal de la première hélice participe lui aussi à la liaison en s'enroulant dans le sillon mineur pour ajouter de la spécificité (Gehring et al., 1994). Malgré tout, l'homéodomaine à lui seul contribue à peu de spécificité et les grands axes de classification des facteurs à boîte homéo reflètent à toutes

fins pratiques certaines des stratégies contenues dans leur structure pour augmenter l'affinité de liaison à l'ADN.

1.6.2 Classification des facteurs de transcription à boîte homéo

De façon générale, les protéines à boîte homéo sont organisées en classes par homologie de séquence par rapport au membre fondateur de cette classe. Ces classes peuvent être regroupées en super classes et/ou divisées en sous-classes, famille et sous-famille.

Super classe HOM-C/Hox : Il s'agit des membres de sept classes de facteurs à boîte homéo qui ont en commun de posséder une glutamine en position 9 de la troisième hélice.

Super classe PRX : Il s'agit des facteurs dont l'homéodomaine présente une homologie significative avec celui du facteur Paired. Ils sont regroupés en deux classes, Paired et Paired-like. Les membres de la classe Paired possèdent une serine en position 9 de la troisième hélice alors qu'une glutamine ou une lysine à cette position définissent les deux sous-classes de la classe Paired-like. Mais ce qui distingue vraiment les deux classes est la présence d'un domaine particulier, appelé Paired (128 aa), dans la classe Paired. Ce domaine est composé de deux

sous-domaines structurés en hélice-tour-hélice et celui qui est en position N-terminale lie l'ADN dans les sillons majeur et mineur (Treisman et al., 1991).

Classe POU : Cette classe est nommée ainsi d'après les premières lettres des noms des trois membres fondateurs (Pit1, Oct1 et Unc86). Ces protéines ont un domaine POU de 75aa en plus de l'homéodomaine. Il lie l'ADN et contribue à augmenter la spécificité de liaison de l'homéodomaine (Jacobson et al., 1997).

Classe LIM : Comme pour la classe POU, on s'est servi des trois fondateurs (Lim1, Isl1 et Mec3) pour nommer cette classe dont les membres possèdent un domaine LIM à l'extérieur du domaine homéo de liaison à l'ADN. Les domaines LIM sont impliqués dans les interactions protéines-protéines (Schmeichel and Beckerle, 1994).

Classe des divergents : On se réfère ici aux protéines dont la séquence primaire de l'homéodomaine est divergente de celles des autres classes alors que la séquence tertiaire est superposable à celle d'un homéodomaine classique.

1.6.3 La famille Pitx

Les facteurs de transcription de la famille Pitx sont des membres de la classe Paired-like avec une lysine en position 9 de la troisième hélice, donc de la

sous-classe Bicoïde du nom du facteur de drosophile, Bicoïde. Chez les mammifères, les autres membres de la sous-classe Bicoïde sont les membres des familles Goosecoïde et Otx, ces derniers étant les plus proches des Pitx. Tous les membres de cette sous-classe, à cause de la lysine en position 9 de l'hélice de reconnaissance, se lient préférentiellement à l'élément TAATCC.

1.6.3.1 Pitx1

Le premier membre qui définit la famille Pitx, Pitx1, a été cloné en tant qu'activateur transcriptionnel du gène de la POMC dans l'hypophyse (Lamonerie et al., 1996). Il a par la suite été cloné dans d'autres laboratoires comme facteur interagissant avec le facteur de transcription POU Pit1 (Szeto et al., 1996) et pour son expression dans les membres postérieurs (Shang et al., 1997).

Il y a deux sites d'expression majeure de Pitx1 au cours du développement. Pitx1 apparaît au jour e7,0 dans la lame latérale du mésoderme postérieur de l'embryon ainsi que dans le mésoderme extraembryonnaire (Lanctôt et al., 1997). Chez l'embryon, les dérivés du mésoderme de la lame latérale postérieure, dont les membres postérieurs, continueront d'exprimer Pitx1. Qui plus est, Pitx1 est requis pour l'établissement de l'identité postérieure de ces membres (Marcil et al., 2003; Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999) et peut induire des caractéristiques morphologiques postérieures lorsqu'on l'exprime de façon ectopique dans les

membres antérieurs de poulet à l'aide d'un rétrovirus (Logan and Tabin, 1999). À l'échelle moléculaire, Pitx1 est un activateur en amont de Tbx4 (Logan and Tabin, 1999; Lanctôt et al., 1999b), un facteur à boîte T qui est directement impliqué dans l'établissement de l'identité des membres postérieurs (Takeuchi et al., 1999; Logan et al., 1998b; Logan and Tabin, 1999).

L'autre site d'expression de Pitx1 est l'ensemble des dérivés du bourrelet neural antérieur (Voir Annexe I). Cette expression dans la structure médiane la plus antérieure du développement précoce des vertébrés n'est pas sans rappeler celle de Bicoïde dans la région la plus antérieure de l'embryon de drosophile où il joue un rôle dans l'établissement des axes (St-Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992) . Chez la souris, elle est détectée à e8,0 dans l'épithélium de la future cavité orale ou stomodeum et suit dans ses dérivés, soit la poche de Rathke, le nasopharynx et les épithélia oraux et olfactifs (Lanctôt et al., 1997). À e9,5, Pitx1 est détecté dans le mésenchyme de la première arche branchiale qui formera principalement le cartilage de Meckel, précurseur de la mâchoire inférieure, puis dans l'épithélium dentaire. Dans l'ablation génique de Pitx1, la mâchoire inférieure des souris est sous-développée. Ce phénotype rappelle les symptômes du syndrome de Treacher-Collins-Franceschetti chez l'humain. Or, le gène *PITX1* est sur le chromosome 5q31-35 qui est situé à proximité du locus associé à ce syndrome (Crawford et al., 1997). D'autres caractéristiques phénotypiques sont la présence d'une fente palatine ainsi que d'une langue fourchue. Enfin, on observe

l'absence de dérivés de la première arche branchiale comme le cartilage de Meckel (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999).

1.6.2.2 Pitx2

PITX2 a d'abord été identifié chez l'humain par clonage positionnel, à 4q21-22, comme gène responsable du syndrome cranio-facial autosomal dominant de Rieger (Semina et al., 1996), ainsi que comme membre de la famille Paired (Mucchielli et al., 1996) et membre de la famille Bicoïde (Gage and Camper, 1997). Dans les structures antérieures de l'organisme, le patron d'expression de *Pitx2* recouvre globalement celui de *Pitx1* dans le stomodeum puis dans l'hypophyse avec quelques différences. Par exemple, l'expression épithéliale de *Pitx2* se restreint à la plaque puis à l'épithélium dentaires (Mucchielli et al., 1997). En outre, alors que *Pitx1* est surtout exprimé dans la future mâchoire inférieure, *Pitx2* est exprimé dans la mâchoire supérieure (Semina et al., 1996). De plus, *Pitx2*, mais non *Pitx1*, est exprimé au cours du développement de l'œil (Hjalt et al., 2000; Semina et al., 1997; Alward et al., 1998; Mucchielli et al., 1996). Dans le syndrome de Rieger, ce sont surtout la mâchoire supérieure (hypoplasie) et les développements dentaire et oculaire qui sont affectés (Semina et al., 1996). Ce qui suggère encore une redondance fonctionnelle avec *Pitx1*.

Pitx2 existe sous trois isoformes. Les formes a et b sont produites par épissage alternatif alors que la forme c est le fait d'un promoteur alternatif. (Gage and Camper, 1997; Campione et al., 1999). Dans l'hypophyse, Pitx2c uniquement est exprimé dans les corticotropes et pas Pitx2a, ni Pitx2b alors que ces deux isoformes sont exprimées dans toutes les autres lignées hypophysaires (Gage and Camper, 1997; Gage et al., 1999).

À part cette exception, les patrons d'expression des formes a et b sont symétriques et celui de la forme c est asymétrique (Schweickert et al., 2000). En effet, Pitx2c est exprimé dans la lame latérale gauche du mésoderme embryonnaire et participe à l'établissement de l'axe gauche-droite. Son expression devient symétrique dans des cas de *situs invertus* (Logan et al., 1998a; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998). De plus, Pitx2 est activé du côté gauche par des protéines de l'établissement de l'axe gauche-droite de l'embryon telles que Shh, Nodal ou Lefty (Harvey, 1998).

Pitx2 a généré l'intérêt de beaucoup d'équipes de recherche. Celles-ci ont réalisé l'ablation génique de *Pitx2* (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999). Ce qui suit est un bref survol des conséquences de cette inactivation génique. Il y a létalité dans un tiers des embryons à partir du jour e9,25. On a pu constater chez les embryons qui vivent plus longtemps que le retournement asymétrique de l'embryon sur lui-même qui ferme les cavités thoraciques et abdominales est bloqué dans 50% des cas. Les organes de ces

cavités se retrouvent alors exposés. Le développement du coeur, un autre organe dont le développement est asymétrique, est normal au début mais, dans 50% des cas, il est plus tard déplacé vers la droite au lieu de rester au centre. On note aussi une hypoplasie des ventricules et une compartimentalisation incomplète des cavités cardiaques. Pour ce qui est des poumons, le poumon gauche normalement à quatre lobes ressemble désormais à une image miroir du poumon droit qui possède un lobe. Ajoutons aussi que l'orientation d'organes viscéraux comme l'estomac est changée. Par contre, les marqueurs impliqués dans la cascade d'identification de l'axe gauche-droite, *Nodal* et *Lefty*, sont normalement exprimés (Lin et al., 1999). Ce qui place *Pitx2* en aval de ces facteurs et fait de lui un effecteur. D'ailleurs, le gain de fonction qui consiste à faire exprimer *Pitx2* dans la lame mésodermale droite chez le poulet ou le xénope provoque le retournement dans l'autre sens de l'embryon et affecte la courbure du tube cardiaque et de l'intestin (Logan et al., 1998a; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Campione et al., 1999).

Pour ce qui est des sites d'expression médians ou symétriques de *Pitx2*, nous avons déjà mentionné le blocage du développement de l'hypophyse à un stade ressemblant physiquement à celui de e10,5 permettant seulement l'expression du marqueur hormonal POMC (Voir 1.3.4.1.2). En outre, le développement des dents est initié de façon normale mais ne progresse pas vers le stade de bourgeon dentaire. Celui des yeux est défaillant à de nombreux niveaux et on note des malformations de la pupille, une absence de cavité interne de l'œil, de

cornée différenciée et de muscles extraoculaires (Lu et al., 1999). Ces structures sont aussi celles qui sont atteintes dans le syndrome de Rieger.

1.6.2.3 Pitx3

Pitx3 a été cloné par homologie avec Pitx1 et 2 (Semina et al., 1998; Smidt et al., 1997). Il est exprimé dans le cristallin à partir de sa formation au jour e11,0 et est à l'origine de cas de cataractes familiales (Semina et al., 1998). Pitx3 est aussi exprimé dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ce sont ces neurones qui dégénèrent dans la maladie de Parkinson et Pitx3 est un activateur transcriptionnel du gène de la tyrosine hydroxylase, une enzyme de la voie de synthèse de la dopamine (Lebel et al., 2001).

Les souris *aphakia* sont des mutantes naturelles dans lesquelles des régions 5' de Pitx3 sont perdues (Semina et al., 1998). Elles développent des cristallins anormaux et les neurones dopaminergiques (TH+) dégénèrent, indiquant que Pitx3 aurait au moins un rôle à jouer dans le maintien de ces neurones, ce qui a pour conséquence une diminution de l'activité locomotrice chez ces souris (van den Munckhof et al., 2003). Par conséquent, une déficience en Pitx3 est une cause potentielle de maladie de Parkinson.

1.7 Facteurs de transcription à motif bHLH

Les facteurs de transcription à domaine basique hélice-boucle(*loop*)-hélice régulent la transcription de leurs gènes-cibles sous forme de dimères et des cascades de bHLH sont impliquées dans des événements de différenciation.

1.7.1 Structure, liaison à l'ADN et dimérisation

Le domaine bHLH est divisé en deux parties fonctionnelles. Le sous-domaine basique (12 aa commençant par une arginine) est responsable de la liaison à l'ADN et le domaine HLH de la dimérisation. La première hélice est longue de 16 aa, la boucle de 8 à 23 aa et la deuxième hélice de 18 aa. Les dimères de bHLH lient une séquence consensus NCANNTGN appelé boîte E.

1.7.2 Classification des facteurs bHLH

La classification des facteurs bHLH reflète certaines caractéristiques transcriptionnelles et de dimérisation.

Classe A : Ce sont les bHLH ubiquitaires qui régulent la transcription de leurs gènes cibles sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères. Dans cette classe,

on retrouve des protéines telles que E2-2, HEB ou les produits du gène *E2A*. Le gène *E2A* produit deux transcrits par épissage différentiel Pan1 (E47) et Pan2 (E12). Il n'y a que neuf acides aminés qui sont différents dans la partie N-terminale entre les deux isoformes. Ceci aurait pour conséquence de défavoriser la formation d'homodimères de E12 (Sun and Baltimore, 1991) et de favoriser la liaison à l'ADN sous forme d'hétérodimère avec des protéines de la classe B.

Classe B : Ces facteurs sont d'expression restreinte et hétérodimérisent avec des facteurs de la classe A. Le facteur NeuroD1 fait partie de cette classe.

Classe N : Il s'agit de bHLH répresseurs divisés en deux sous-classes. Les protéines de la famille Id qui possèdent un domaine HLH mais pas de domaine basique. Ils peuvent dimériser avec d'autres bHLH mais pas lier l'ADN. Ces protéines se comportent donc comme des négatifs dominants. Les membres de l'autre sous-classe peuvent dimériser et exercer une répression directe en se liant à une boîte E modifiée, la boîte N.

1.7.3 Facteurs bHLH et différenciation cellulaire

Des facteurs bHLH sont impliqués en cascade dans différents événements de différenciation. La plus étudiée est la différenciation myogénique initiée par les bHLH Myf5 et MyoD. Ces deux facteurs induisent en cascade d'autres facteurs

bHLH impliqués dans la réalisation de la différenciation. Cette cascade dans le muscle a servi de référence pour l'étude d'autres systèmes comme les systèmes hématopoïétique et nerveux. Cependant, puisque NeuroD1 a été cloné pour son implication dans la différenciation neuronale, nous traiterons plutôt de la différenciation neurale et du rôle qu'y joue NeuroD1. Par ailleurs, NeuroD1 a aussi été cloné comme régulateur du gène de l'insuline sous le nom de BETA2. Et, un peu comme lors de la différenciation neurale, NeuroD1 (BETA2) joue un rôle dans la différenciation des cellules β du pancréas au sein d'une cascade de facteurs bHLH neurogéniques.

1.7.5.1 Facteurs bHLH neurogéniques, NeuroD1 et neurogénèse

Chez la drosophile, les organes du système nerveux périphérique se divisent en organes sensoriels externes et en organes internes chordotonaux. Le développement de ces deux sous-systèmes dépend, dans le premier cas du bHLH achaete-scute et de atonal dans le deuxième (Hassan and Bellen, 2000; Ruiz-Gomez and Ghysen, 1993; Jarman et al., 1995). NeuroD1 est l'orthologue d'atonal chez les vertébrés.

NeuroD1 a été cloné par une méthode classique de double hybride à l'aide du domaine bHLH de daughterless, un bHLH ubiquitaire de drosophile à partir d'ADNc de tumeurs de cellules souches embryonnaires. Dans le système nerveux

murin, il est exprimé à partir du jour e9,5 dans les ganglions trigéminaux et à e11,5 dans les ganglions crâniens V à XI. Il est aussi exprimé dans le manteau superficiel, une région du cerveau et de la moelle épinière qui contient des neurones post-mitotiques en cours de différenciation terminale. L'expression de NeuroD1 s'éteint en grande partie dans le système nerveux au jour e14,5, soit à peu près en même temps qu'elle s'éteint dans les cellules corticotropes de l'hypophyse. Cette expression persiste toutefois dans certaines régions du système nerveux comme le système olfactif (Lee et al., 1995).

Le rôle pro-neural de NeuroD1 a été mis en évidence chez le xénope par expression ectopique de NeuroD1. Lorsque l'ARNm de xNeuroD1 est injecté dans l'une des deux cellules-filles du zygote, les zones de différenciation neurale, les plaques neurales, s'accroissent dans les structures dérivées de la cellule injecté (Lee et al., 1995). Dans le cas de l'ablation génique, les souris meurent pour des raisons liées à son rôle dans l'expression pancréatique d'insuline dont on discutera plus bas, mais il y a peu d'effets visibles dans le système nerveux (Naya et al., 1997). Il est possible qu'il y ait redondance avec d'autres facteurs bHLH neurogéniques comme on l'observe avec les facteurs bHLH myogéniques dans le muscle. Seul un retard de différenciation des neurones du gyrus dentaire de l'hippocampe a été observé. Lorsqu'on compense la perte de NeuroD1 dans le pancréas grâce à un transgène l'exprimant sous le contrôle du promoteur de l'insuline, des nouveaux-nés survivent mais les adultes peuvent souffrir de crises épileptiques limbiques occasionnelles (Liu et al., 2000; Miyata et al., 1999).

1.7.5.2 NeuroD1 (BETA2) et régulation du gène de l'insuline

NeuroD1 a aussi été cloné sous le nom de BETA2 comme activateur transcriptionnel du gène de l'insuline par un criblage en double hybride modifié d'une banque de d'ADNc de cellules HIT (productrices d'insuline) (Naya et al., 1995). Naya et al. ont utilisé le domaine HLH de la protéine ubiquitaire Pan1 pour isoler des partenaires de dimérisation. Et ils ont inséré la boîte E du promoteur de l'insuline dans celui du gène de sélection pour identifier les dimères transcriptionnellement actifs.

NeuroD1 (BETA2) est détecté dans les cellules endocrines du pancréas à partir du jour e9,5 jusqu'à chez l'adulte ainsi que dans les cellules du tube digestif productrices de sécrétine et de cholécystokinine. Les souris dont le gène a été inactivé meurent de diabète aux alentours de la naissance (Naya et al., 1997). Première surprise, on détecte encore des cellules productrices d'insuline dans le pancréas, mais en nombre réduit et les îlots de Langerhans sont mal formés. Deuxième surprise, des injections d'insuline ne réversent pas les symptômes diabétiques. Ceci suggère en plus un problème en aval de la sécrétion d'insuline, comme le récepteur à l'insuline, mais cela impliquerait alors des cellules qui n'expriment pas NeuroD1 mais qui pourraient répondre à des signaux de cellules l'exprimant.

Enfin, les cellules du tube digestif qui expriment NeuroD1 sont absentes. Où plutôt, il y a accumulation de ces cellules à un stade prolifératif. Or NeuroD1 est habituellement exprimé dans ces cellules au stade de différenciation qui suit. Dans les souris NeuroD1 $-/-$, la phase de prolifération est plutôt suivie d'une phase d'apoptose. Un mécanisme explicatif serait l'absence d'induction de p21 par NeuroD1 pour sortir les cellules du cycle cellulaire (Mutoh et al., 1997; Mutoh et al., 1998), tout comme l'induction de p21 par MyoD induit les cellules musculaires à sortir du cycle cellulaire (Walsh and Perlman, 1997).

Contrairement à la situation dans le système nerveux, dans le pancréas et le tube digestif, on dispose de l'insuline et de la sécrétine comme gène-cible de NeuroD1 et les propriétés transcriptionnelles de ce facteur ont pu être étudiées. Sur le promoteur de la sécrétine, le domaine bHLH de NeuroD1 interagit avec le co-facteur p300 pour activer de façon synergique la transcription (Mutoh et al., 1997). Une interaction similaire a été observée sur le promoteur de l'insuline, mais cette fois par le domaine C-terminal de NeuroD1 (Qiu et al., 1998; Sharma et al., 1999). Ajoutons que les facteurs Pan, des bHLH ubiquitaires partenaires potentiels de NeuroD1, interagissent eux aussi avec p300 (Eckner et al., 1996). Une interaction d'un hétérodimère NeuroD1/Pan a aussi pu être montrée avec le facteur à boîte homéo Pdx, celle-ci implique les domaines bHLH de l'hétérodimère et l'homéodomaine de Pdx (Ohneda et al., 2000). Ce qui n'est pas sans rappeler l'interaction d'une autre homéoprotéine, Pitx1, avec un hétérodimère NeuroD1/Pan dans l'hypophyse.

1.7.5.3 Cascades de facteurs bHLH neurogéniques dans la différenciation cellulaire

D'autres facteurs bHLH pro-neuraux ont été identifiés en plus de NeuroD1. C'est le cas des facteurs neurogénine 1 et 2 qui sont exprimés lors de la neurogénèse (Ma et al., 1996; Ma et al., 1997; Olson et al., 1998). Neurogénine 1 peut aussi induire la voie de différenciation neurale, comme NeuroD1. Cependant, *in vivo* il semblerait plutôt que Neurogénine 1 et 2 soient des facteurs de détermination qui engagent les cellules qui les expriment dans la voie neuronale, comme MyoD et Myf 5 dans la voie musculaire, alors que NeuroD1 est un effecteur de la différenciation terminale. Un exemple concret est la différenciation des ganglions trigéminaux (Ma et al., 1998; Ma et al., 1999). Chez la souris, l'expression de neurogénine 1 débute à e8,25 dans la placode trigéminale, elle est suivie de celle de NeuroD1 à 8,75 et de celle d'un autre bHLH NSCL1 à e9,0. NSCL1 serait impliqué dans le maintien de l'identité neuronale des cellules qui l'expriment. La relation en cascade est montrée en partie par l'ablation génique de neurogénine puisque, dans ce cas, NeuroD1 et NSCL1 ne sont plus exprimés (Ma et al., 1997).

Une cascade de facteurs bHLH neurogéniques existe aussi dans le pancréas. L'expression de NeuroD1 dépend de celle du facteur Neurogénine 3 en

amont (Schwitzgebel et al., 2000). Il ne semble pas cependant y avoir de facteur jouant le rôle de NSCL1, sauf peut-être NeuroD1 lui-même puisqu'il est exprimé dans le pancréas adulte (Gradwohl et al., 2000).

Il existe d'autres facteurs bHLH pro-neuronaux de vertébrés comme les facteurs MASH-1 (*mamalian achaete scute homolog 1*) (Lo et al., 1991) et MASH-2 (Johnson et al., 1992) qui sont exprimés dans l'hypophyse. Cependant, ils ne semblent pas avoir de rôle dans l'activation de NeuroD1 et la différenciation des cellules corticotropes (Poulin, non publié).

1.8 Facteurs de transcription à boîte T

Bien que le membre fondateur de la famille des facteurs à boîte T a été cloné il y a quatorze ans, la préhistoire de ces protéines remonte à la fin des années 20 quand Dobrovolskaïa-Zavadskaïa et al (1927) soumièrent des souris à des rayons X dans le but de générer un modèle de mammifère pour étudier l'hérédité. Certains de leurs rejetons présentaient un phénotype facile à suivre, dit Brachyure, soit une queue plus courte voire absente. C'est en ouvrant des femelles gestantes qu'on a découvert que la mutation, renommée Brachyury ou T (pour *Tail*), causait une malformation de la queue à l'état hétérozygote et une absence de formation de la notochorde et de tout le mésoderme postérieur, incluant l'allantoïde chez l'homozygote. L'absence de ce "sac à déchet embryonnaire" entraîne la mort de

l'embryon de souris vers le jour e10,5 fort probablement par empoisonnement. Nous avons déjà mentionné dans l'introduction comment les souris Brachyury intéressèrent les embryologistes, entre autres, dans la rencontre entre la génétique et la biologie du développement, c'est à dire par l'analyse de la transmission héréditaire d'un défaut de mécanisme développemental.

Le début de l'ère moderne de l'étude des facteurs à boîte T commence en 1990 par le clonage du gène responsable de la mutation (Herrmann et al., 1990), ce qui permit de réaliser que la protéine Brachyury était exprimée dans les structures manquantes chez les mutants, soit le sillon primitif puis la notochorde et le mésoderme postérieur (Wilkinson et al., 1990). Peu de temps après, Pflugfelder et al (1992) identifièrent une région d'homologie, environ 180 acides aminés qui prendront plus tard le nom de boîte T, entre Brachyury et une protéine de drosophile, opto-motor-blind, qui n'était pas l'orthologue de Brachyury. Ceci suggéra l'existence d'une nouvelle famille de protéines. Dans le même temps, on commença à identifier des orthologues et des homologues de Brachyury dans de nombreuses espèces animales depuis ceux qu'on dit les plus primitifs, comme l'hydre, jusqu'aux mammifères (Papaioannou, 2001). Curieusement, aucun facteur à boîte T n'a été cloné chez les procaryotes, les unicellulaires eucaryotes, les fungi ou les plantes. Les facteurs à boîte T seraient donc des marqueurs de métazoaires.

Les facteurs à boîte T sont regroupés en sept sous-familles en fonction de leur degré d'homologie, ce qui revient à les classer en famille de paralogues.

1.8.1 Structure et activité transcriptionnelle

Pflufelder et al (1992) furent les premiers à noter que la boîte T pouvait lier l'ADN, mais des études plus exhaustives furent menées par Kispert et Herrmann (1993). La séquence consensus de liaison aux boîtes T est TCACACCT, appelée élément T. Les structures cristallographiques des boîtes T de Xbra et hTbx3 sur l'ADN ont été obtenues. Xbra lie l'ADN en dimère sur deux éléments T en tête-à-tête (Muller and Herrmann, 1997) alors que hTbx3 lie l'élément T en monomère (Coll et al., 2002). L'interaction ADN-protéine est d'un nouveau genre : une hélice en C terminal s'insère dans le sillon mineur en élargissant l'ADN sans le courber.

Les premières études transcriptionnelles avec Brachyury sur des promoteurs artificiels montrèrent que la distance et l'orientation relative entre les deux éléments T étaient importants pour l'activation du gène rapporteur (Kispert et al., 1995). Par exemple, un arrangement en répétitions directes séparées par 6 pb (DR6) a un effet cis-activateur alors qu'un DR23 est inactif. Ces arrangements d'éléments T semblent avoir une spécificité de liaison différente pour différents facteurs. Ainsi, un dimère de Xbra, mais pas de VegT, lie deux éléments T en tête à tête alors qu'un dimère de VegT, mais pas de Xbra, lie les éléments en queue-à-queue (Conlon et al., 2001). Les auteurs de cette étude ont aussi montré que la spécificité de liaison de trois protéines de Xénope, Xbra, VegT et Eomesodermin,

dépendait d'un acide aminé en particulier de la boîte T pour chacun d'entre eux. Toutefois, cette l'affinité de liaison ne suit pas la spécificité et les auteurs estiment que l'interaction avec d'autres protéines pourrait être nécessaire pour augmenter cette affinité.

Le peu de facteurs à boîte T sur lesquels on dispose de données transcriptionnelles et de gènes-cibles sont en grande majorité des activateurs transcriptionnels. Ils lient les promoteurs en monomère sur un ou plusieurs éléments T ou en dimère sur des répétitions directes ou inversées. Par exemple, Xbra active l'expression de eFGF au cours de la gastrulation amphibienne en liant deux éléments T séparés dans le promoteur de eFGF (Casey et al., 1998). Dans l'embryon de xénope, le promoteur de l'homéofacteur Bix4, qui peut être activé par VegT, contient un palindrome et un monomère (Casey et al., 1999). Dans le cœur des mammifères, Tbx5 lie un seul élément T pour activer la transcription de la connexine 40 et du facteur atrial natriurétique des oreillettes (Bruneau et al., 2001). Et, dernier exemple, chez l'ascidie *C. Intestinalis*, le promoteur du gène *Citrop* contient cinq éléments T qui peuvent être liés par AsT. Deux sont arrangés en palindrome, deux en répétition directe et un est isolé (Di Gregorio and Levine, 1999).

On connaît aussi deux facteurs répresseurs, Tbx2 et Tbx3. Ces facteurs sont porteurs d'un domaine de 90 acides aminés en C-terminal dont la fonction répressive est conservée chez les espèces testées, soit l'humain, la souris et le

xénope (Carreira et al., 1998; He et al., 1999). Ajoutons que la région N-terminale du facteur Xtbx3 affecte la transcription différemment selon le contexte cellulaire (He et al., 1999). Enfin, le facteur T-bet (Tbx21) active le gène de l'interféron γ et réprime celui de l'interleukine 2 dans les cellules T *helper* 1 (Szabo et al., 2000). Les sites de liaison présumés dans les deux promoteurs sont des palindromes d'éléments T similaires, ce qui suggère l'implication d'autres molécules avec lesquelles T-bet interagirait pour activer ou réprimer l'activité transcriptionnelle selon le cas.

1.8.2 Facteurs à boîte T et développement

La grande majorité des gènes à boîte T a été clonée une première fois par homologie et une bonne partie a été identifiée par les projets de séquence du génome de divers organismes, c'est ce qui explique que l'on connaisse peu de gènes-cibles et qu'on ait peu d'information au niveau transcriptionnel à leur sujet, comme leurs partenaires transcriptionnels par exemple. Notons à ce sujet que Tbx5 interagit avec Nkx2.5 pour activer les promoteurs des gènes de l'ANF et *cnx40* dans le cœur (Bruneau et al., 2001).

On dispose par contre de beaucoup plus d'informations de type génétique ou développemental. La plupart du temps, elles proviennent du patron d'expression de ces gènes et de l'analyse d'expériences de perte ou de gain de fonction. Il

apparaît donc que, de façon générale, les protéines à boîte T ont un rôle important à jouer au cours du développement et qu'elles peuvent être impliquées dans des événements de différenciation ou de morphogénèse. Elles ont un patron d'expression restreint à certains tissus et sont requises pour le développement normal de ces tissus. Ces capacités peuvent en faire à l'occasion des gènes sélecteurs entre deux voies possibles. Par exemple, Tbx4 et Tbx5 sont exprimés respectivement dans les membres postérieurs et antérieurs et ils sont requis pour déterminer leur identité (Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). En absence de Tbx6, deux tubes neuraux se forment de chaque côté du tube neural central à la place du mésoderme paraxial qui donne naissance aux somites (Chapman and Papaioannou, 1998). T-bet (Tbx21) est requis pour la différenciation des cellules T *helper* de type 1 aux dépens de celles de type 2 (Szabo et al., 2000). Chez *C. Elegans*, l'inactivation de Tbx12 (Tbx20 chez les mammifères) remplace les lignées B et F des régions postérieures de l'embryon en lignée Y et U (Woollard and Hodgkin, 2000).

Ces facteurs de transcription peuvent jouer leur rôle à différentes étapes du développement. Pour donner quelques exemples, VegT est exprimé dans l'ovule chez *Xénope* et est un marqueur moléculaire de la division pôle animal / pôle végétal lors du clivage de l'œuf (Zhang and King, 1996). Brachyury est requis pour la formation du mésoderme lors de la gastrulation (Hermann et al., 1990; Stott et al., 1993). Tbr1 est exprimé dans le télencéphale juste après la fermeture antérieure de la gouttière neural, à e10,0 chez la souris (Bulfone et al., 1995). Tbx2, 3, 4 et 5

sont exprimés dans les membres lors de leur développement (Gibson-Brown et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1998) et Tbx2 est exprimé dans le cœur adulte mais pas fœtal (Bollag et al., 1994). Ajoutons aussi que si des gènes comme Brachyury ou Tbx6 sont exprimés dans des systèmes à potentialités multiples, comme ici le mésoderme postérieur, d'autres sont exprimés dans des systèmes en voie de différenciation terminale comme T-bet (Tbx21) dans le sous-type 1 des cellules T *helper* (Szabo et al., 2000).

Les gènes de la famille des protéines à boîte T ont des patrons d'expression qui couvrent différentes structures à différentes étapes du développement. Des expériences de perte ou gain de fonction ont mis en évidence l'importance de ces gènes pour le développement de ces organes ainsi que l'importance du dosage des protéines codées par ces gènes. Chez l'humain, ces caractéristiques ont été mises en évidence par l'existence de nombreuses malformations congénitales associées à des mutations dans certains gènes à boîte T (Tableau II-2). Ces syndromes sont le fait de pertes de fonction. Mais des gains de fonction de certains facteurs à boîte T sont aussi associés à des pathologies. Par exemple, une sur-activation de T-bet est associée à la maladie de Behcet (Li et al., 2003). Et l'expression de Tbx2 est amplifiée dans certains cas de cancer du sein (Jacobs et al., 2000). Donc, pour exercer leur rôle correctement, certains facteurs à boîte T nécessitent un dosage adéquat.

Tableau I-2 : Facteurs à boîte T impliqués dans des pathologies congénitales et cancers

Syndrôme	Gène impliqué	Phénotype	Référence
DiGeorge	Tbx1	Malformations cardiaques, des arches pharyngées et dérivés de la crête neurale	Jerome (2001) Lindsay (2001) Merscher(2001)
Radio-mammaire	Tbx3	Malformation des avants-bras, seins, dents, parties génitales	Bamshad (1999, 1997)
Holt-Oram	Tbx5	Malformations cardiaques et des membres antérieurs	Basson (1999, 1997), Li (1997)
Bardet-Biedl	Tbx10	Polydactylie, obésité, malformations rénales, hypogonadisme, retard mental	Law (1998)
Apparence d'acromégalie faciale	Tbx15	Arcades sourcilières sur-développées, lèvres et paupières épaissies, grosses mains	Agulnik (1998)
Fente palatine liée à l'X	Tbx22	Fente palatine, bec de lièvre ankyloglossie	Braybrook (2002, 2001)
Maladie de Behcet	Tbx21	Symptômes inflammatoires multiples, atteinte des vaisseaux sanguins en particulier	Li (2003)
Cancer du sein	Tbx2	Amplification dans certains cas	Jacobs (2000)

1.9 Objectif de ce travail

L'objectif de ce travail a été d'étudier les mécanismes transcriptionnels histo-spécifiques du gène POMC de l'hypophyse dans le but d'en arriver à identifier et caractériser les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules corticotropes. L'analyse du promoteur POMC a permis d'identifier deux éléments qui activent synergiquement l'expression de la POMC de façon histo-spécifique. L'un de ces éléments est une boîte E sur laquelle se lie un hétérodimère de facteurs bHLH contenant NeuroD1 qui est d'expression restreinte aux corticotropes. L'autre est un élément lié par l'homéofacteur Pitx1. Pitx1 et l'hétérodimère de bHLH interagissent physiquement et fonctionnellement. Dans un premier temps, j'ai contribué à montrer que Pitx1 est exprimé dans tout le stomodeum et toute l'hypophyse qui en dérive (Annexe 1). Ceci, et d'autres résultats, a exclu Pitx1 du rôle d'activateur histo-spécifique de l'élément de réponse à Pitx1 et suggérait qu'un autre facteur liait cet élément.

J'ai donc entrepris d'identifier cet autre facteur de transcription qui activerait le promoteur POMC de façon histo-spécifique (Chapitre 2). Ces travaux ont mené au clonage de Tpit, un nouveau facteur de transcription à boîte T. Tpit est uniquement exprimé dans les cellules POMC de l'hypophyse et il active la transcription du gène POMC en synergie avec Pitx1. Tpit était donc bien la pièce manquante du casse-tête.

De plus, l'expression de Tpit débute peu avant celle de POMC à e12,5 et les expériences de gain et de perte de fonction ont démontré l'importance de Tpit dans la différenciation des cellules POMC de l'hypophyse. J'ai donc tenté d'identifier les régions régulatrices de l'expression de Tpit dans le but de remonter la cascade des événements moléculaires menant à la différenciation des cellules corticotropes (Annexe II).

Ensuite, puisque NeuroD1 est lui aussi un activateur de la POMC d'expression restreinte aux corticotropes, j'ai cherché à savoir s'il avait lui aussi un rôle important pour la différenciation des cellules corticotropes (Chapitre 3). Enfin, j'ai construit un modèle de complexe transcriptionnel histo-spécifique jouant un rôle au cours de la différenciation corticotrope.

Chapitre 2

A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins

Autres collaborateurs :

Anne-Marie Pulichino, Thomas Lamonerie, Yves Gauthier,
Thierry Brue, Alain Enjalbert et Jacques Drouin

Publié dans *Cell* 104 : 849-859, 2001

2.1 Summary

The pituitary gland has provided unique insight into molecular mechanisms and regulatory factors controlling both differentiation and gene transcription. We identified Tpit, a novel T-box factor only present in the two pituitary POMC-expressing lineages, the corticotrophs and melanotrophs, and apparently in no other tissue, including hypothalamic POMC neurons. In pituitary cells, Tpit activation of POMC gene transcription requires cooperation with Pitx1, the two factors binding to contiguous sites within the same regulatory element. In gain-of-function experiments, Tpit induces POMC expression in undifferentiated pituitary cells, indicating that it can initiate differentiation into POMC-expressing lineages. TPIT gene mutations were found in patients with isolated deficiency of pituitary POMC-derived ACTH, in support of an essential role of Tpit for differentiation of the pituitary POMC lineage.

2.2 Introduction

The pituitary gland contains two pro-opiomelanocortin (POMC)-expressing lineages, the ACTH-producing corticotrophs in the anterior lobe, and the α -MSH-producing melanotrophs in the intermediate lobe. The corticotrophs are the first hormone-producing cells of the pituitary to reach terminal differentiation. Expression of POMC starts in corticotrophs at about day 12,5 of

embryonic development (e12,5) in the mouse (Japon et al., 1994). The appearance of other hormone-producing lineages follows: the three Prop1 (Sornson et al., 1996) and Pit1/GHF-1 (Bodner et al., 1988; Ingraham et al., 1988) dependent lineages give rise to TSH-positive thyrotrophs around e14,5, to GH-positive somatotrophs around e15,5 and to prolactin expressing lactotrophs on e16,5 (Japon et al., 1994). The GATA-2 (Dasen et al., 1999) and SF-1 (Ikeda et al., 1995; Ingraham et al., 1994) dependent gonadotrophs appear around e16,5. The control of pituitary cell differentiation has been shown to depend on a limited set of lineage-restricted transcription factors such as those indicated above. The same factors were also shown to play important roles for transcription of hormone-coding genes that mark each lineage [reviewed in (Kioussi et al., 1999; Sheng and Westphal, 1999)]. The mechanisms for corticotroph differentiation remain an open question. Only one transcription factor has so far been shown to be restricted to this lineage in the pituitary, NeuroD1 (Poulin et al., 2000), but it does not appear to be sufficient for corticotroph differentiation (G. Poulin, J.Drouin, K. Chu, M. Tsai, unpubl.). In order to identify candidate factor(s) for this role, we have investigated transcriptional regulatory mechanisms of the POMC gene for new transcription factors of highly cell-restricted distribution.

Cell-specific transcription of pituitary hormone-coding genes relies on a combination of cell-restricted and tissue (pituitary)-restricted transcription factors (Kioussi et al., 1999; Sheng and Westphal, 1999). The tissue-restricted factors Pitx1/2 and Lhx3/4 are expressed early relative to pituitary development and much

before the onset of terminal cell differentiation. Pitx1 and Pitx2 are closely related homeodomain (HD) transcription factors of the *paired* subfamily (Gage and Camper, 1997; Lamonerie et al., 1996; Szeto et al., 1996). The Pitx HD has a lysine residue at position 50 and a DNA-binding specificity related to *bicoid*; these properties are shared with the related Otx1 and Otx2 factors, as well as with *gooseoid* (Drouin et al., 1998; Gage et al., 1999a; Lamonerie et al., 1996). Pitx1/2 are both expressed from around e8 in the most anterior surface ectoderm (stomodeum) destined to become the oral ectoderm (Lanctôt et al., 1997). Rathke's pouch, the pituitary primordium, develops as an invagination of this ectoderm. Pitx1 and Pitx2 expression is maintained throughout pituitary development, including in adult tissues (Gage and Camper, 1997; Lanctôt et al., 1997; Lanctôt et al., 1999a). Inactivation of the Pitx2 gene or of the Lhx3/4 genes arrests pituitary development at the Rathke's pouch stage before the onset of cell proliferation and of all cell differentiation, except corticotrophs (Gage et al., 1999b; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999; Sheng et al., 1997).

The later onset of Lhx3/4 in Rathke's pouch together with *in vivo* and cell culture evidence of an essential role of the *Pitx1* or *2* genes for Lhx3 expression (Tremblay et al., 1998) support the idea that the *Pitx1/2* genes are upstream regulators of transcription factors required for progression of pituitary development and cell differentiation. The *Pitx1* gene does not appear to play as limiting a role during early pituitary morphogenesis; however, *Pitx1*^{-/-} pituitaries have fewer gonadotrophs (Szeto et al., 1999) and this correlates with higher levels

of Pitx1 protein in adult gonadotrophs (Lanctôt et al., 1999a). Thus, the level of Pitx1 appears to affect proliferation and/or maintenance of the gonadotroph lineage. Pitx1 and Pitx2 were shown to be important, but possibly redundant with each other, for transcription of most pituitary hormone coding genes (Tremblay et al., 1998; Tremblay et al., 2000). Their action on cell-specific target genes was found in many cases to result from physical interaction with lineage-restricted transcription factors. Indeed, they were shown to interact with Pit1 in somatotrophs (Szeto et al., 1996; Tremblay et al., 1998) and with SF-1 and Egr-1 (Tremblay et al., 1999; Tremblay and Drouin, 1999) in gonadotrophs. In corticotrophs, transcription of the POMC gene involves physical interaction between Pitx1 and bHLH dimers containing NeuroD1/BETA2 (Poulin et al., 1997; Poulin et al., 2000). NeuroD1 (Lee et al., 1995; Naya et al., 1995) is restricted in its pituitary expression to corticotrophs and the onset of this expression closely precedes that of POMC (Poulin et al., 2000). The corticotroph-restricted expression of NeuroD1 may contribute in some way to differentiation of this lineage, but neither this gene (pers. comm., op. cit.) nor *Pitx1* (Szeto et al., 1996) appear sufficient for either corticotroph- or melanotroph-specific expression of POMC. We have now identified a novel transcription factor of the Brachyury/T-box family whose expression is restricted to pituitary POMC cells, and we show that this factor is an obligate partner of Pitx1 for activation of POMC gene transcription. Further, ectopic expression of Tpit in uncommitted pituitary cells expressing high levels of Pitx1 triggers POMC expression *in vivo* and human TPIT gene mutations are associated with isolated pituitary ACTH deficiency.

2.3 Results

The transcription factor Pitx1 was cloned for its involvement in cell-specific transcription of the POMC gene (Lamonerie et al., 1996). It was identified through its binding to a cell-specific regulatory element, CE3 (Fig. 2.1A). This CE3 element was shown to confer stringent cell-specificity using a panel of pituitary-derived cell lines (Lamonerie et al., 1996). However, Pitx1 is expressed in all pituitary cells (Lanctôt et al., 1999a) and thus it cannot account for corticotroph-specific expression of POMC. We therefore tested whether sequences around the Pitx1 binding site may contribute to transcriptional specificity by recruitment of another DNA-binding factor. The CE3 element was scanned for active sequences using a set of 3 bp mutations (Lamonerie et al., 1996) and assessed for activity in POMC-expressing AtT20 cells (Fig. 2.1B). As expected, mutants M8 and M9 which destroy the Pitx1 binding site are devoid of activity as compared to the intact CE3 element (WT, Fig. 2.1B). In addition, mutants M5 and M6 were also devoid of activity and no more active than the empty reporter plasmid (CTL) suggesting a potential transcription factor binding site. The sequence altered by mutations M5 and M6 contains the motif TCACACCA that is almost identical to a half site of the T element (Kispert and Hermann, 1993), a palindromic binding site for the T-box transcription factor Brachyury (T) (Fig. 2.1C). Thus, a T-box factor may bind the CE3 element.

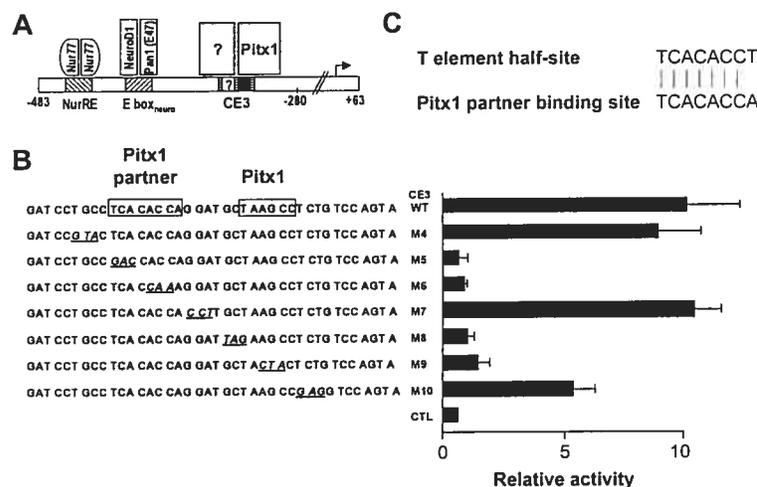


Figure 2.1. A T-box binding site is required for Pitx1

activation of POMC transcription. **A)** Regulatory mechanisms of the POMC promoter (-483 to +63 bp). This promoter fragment is sufficient to mimic pituitary POMC expression in transgenic mice. The CE3 and E boxneuro regulatory elements were previously shown to be required for cell-specific transcription. The CE3 element contains a binding site for Pitx1 (Lamonerie et al., 1996) and for another DNA-binding protein (present work). The E boxneuro is a binding site for bHLH heterodimers containing NeuroD1/BETA2 (Poulin et al., 2000) and the NurRE is a binding site for dimers of the CRH-inducible orphan nuclear receptors related for Nur77 (NGFI-B) (Maira et al., 1999). The arrow indicates the start site of transcription. **B)** Transcriptional activity of reporter plasmids dependent on wild-type or mutant CE3 oligonucleotides. The DNA sequence of the intact CE3 element (WT-CE3) is shown above each transversion mutant (italic and underlined). Three copies of each corresponding oligonucleotide were inserted in a luciferase reporter and tested in POMC-expressing AtT-20 cells. Activity is reported as fold activation relative to the empty reporter (CTL) which contains a minimal *POMC* promoter (-35/+63 bp). Sequences important for reporter activity are boxed and identified. **C)** Sequence alignment of the Pitx1 partner binding site with a T element half-site (Kispert and Hermann, 1993).

2.3.1 *Tpit* is a T-box factor closely related to Brachyury (T)

We used a PCR-based strategy to identify T-box factors present in POMC-expressing cells (Fig. 2.2A). Degenerate primers directed against the most conserved parts of the T-box DNA-binding domain were used to amplify T-box coding fragments from AtT20 cells cDNA. Analysis of the first set of 30 T-box fragments revealed a novel T-box sequence that accounted for 80% of them (24/30). Based on this analysis, the only other T-box that appeared to be expressed in AtT-20 cells is *Tbx1* (Fig. 2.2A). The new T-box factor was called *Tpit*. We subsequently used the *Tpit* PCR fragment to screen an AtT20 cDNA library. The longest clone thus obtained was 2001 bp and contained a 1338 bp open reading frame that is coding for a 446 amino acids protein in phase with the T-box (Fig. 2.2B). Comparison of the *Tpit* sequence with protein databases indicated the greatest homology with T-box genes of unknown function, human *TBX19* (94% homology) and chicken *Ch-TbxT* (77% homology). Thus, these human and chicken genes may be *Tpit* orthologues. Further comparison within the T-box (Fig. 2.2C) revealed that Brachyury (T) is most similar to *Tpit* with 86% identity. Thus, *Tpit* is a member of the Brachyury (T) subfamily by comparison to other T-boxes, which share 58% to 64% homology with the *Tpit* T-box (Fig. 2.2C).

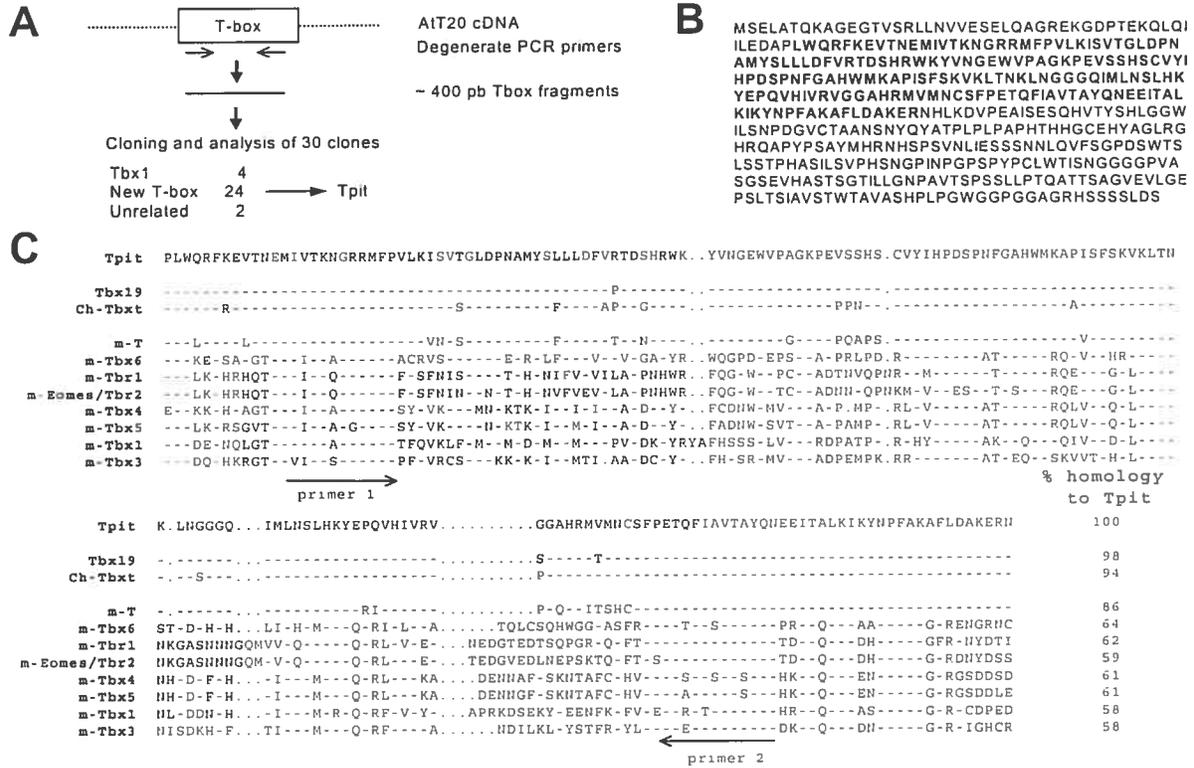


Figure 2.2. Cloning of Tpit, a New T-Box Factor. A) Cloning strategy. Degenerate primers were designed against the most conserved regions of murine T-boxes (C) and used for PCR amplification using cDNA from *POMC*-expressing AtT-20 cells. Thirty clones were analyzed by DNA sequencing. Two were identified as Tbx1 and twenty-four as a novel T-box transcription factor, Tpit. B) Predicted amino acids sequence of Tpit. The DNA binding domain (T-box) is shown in bold. This 446 amino acids sequence was deduced from the DNA sequence of a full-length cDNA clone. C) Comparison of Tpit T-box with putative orthologues Tbx19 (human) and Ch-Tbxt (chicken), and with other murine T-box factors. Identity at the amino acid level is indicated by a dash. Homology is given as percentage relative to Tpit sequence.

2.3.2 Tpit is only present in pituitary POMC-expressing cells

In order to find out if Tpit expression is consistent with a unique role in POMC cell function, we determined the pattern of Tpit expression throughout mouse development and in the adult pituitary gland (Fig. 2.3). By Northern blot, Tpit mRNA was detected in POMC-expressing AtT-20 cells (Fig. 2.3A, B) but not in non-pituitary tissues (Fig. 2.3A) nor in a panel of other pituitary-derived cell lines (Fig. 2.3B). In embryos, Tpit was only detected in the pituitary gland (Fig. 2.3C) and its expression was not detected elsewhere using wholemount *in situ* hybridization (e6,5 to 9,5 embryos, data not shown), section *in situ* hybridization (e10,5 to 14,5, data not shown) or immunohistochemistry (Fig. 2.3C). The earliest expression of Tpit is detected by immunohistochemistry at e12.5 in the nucleus of POMC-expressing cells of the anterior pituitary as shown using consecutive sections revealed with anti-ACTH and anti-Tpit antibodies (Fig. 2.3F and 2.3G). At e13.5, colocalization experiments showed that all POMC-expressing cells (ACTH positive) also express Tpit, but there are cells that express only Tpit (Fig. 2.3H, 2.3I, and 2.3J). The presence of Tpit⁺/POMC⁻ cells is consistent with a putative role of Tpit in corticotroph cell differentiation and activation of POMC transcription. On e15.5, Tpit is now detected in melanotrophs of the intermediate pituitary (Fig. 2.3K and 2.3L). In the adult pituitary, Tpit is expressed in all cells of the intermediate lobe (melanotrophs) and colocalization experiments showed that anterior lobe Tpit is only present in corticotrophs (Fig. 2.3O, 2.3P and 2.3Q). The exclusive expression of Tpit in pituitary POMC cells led us to consider its

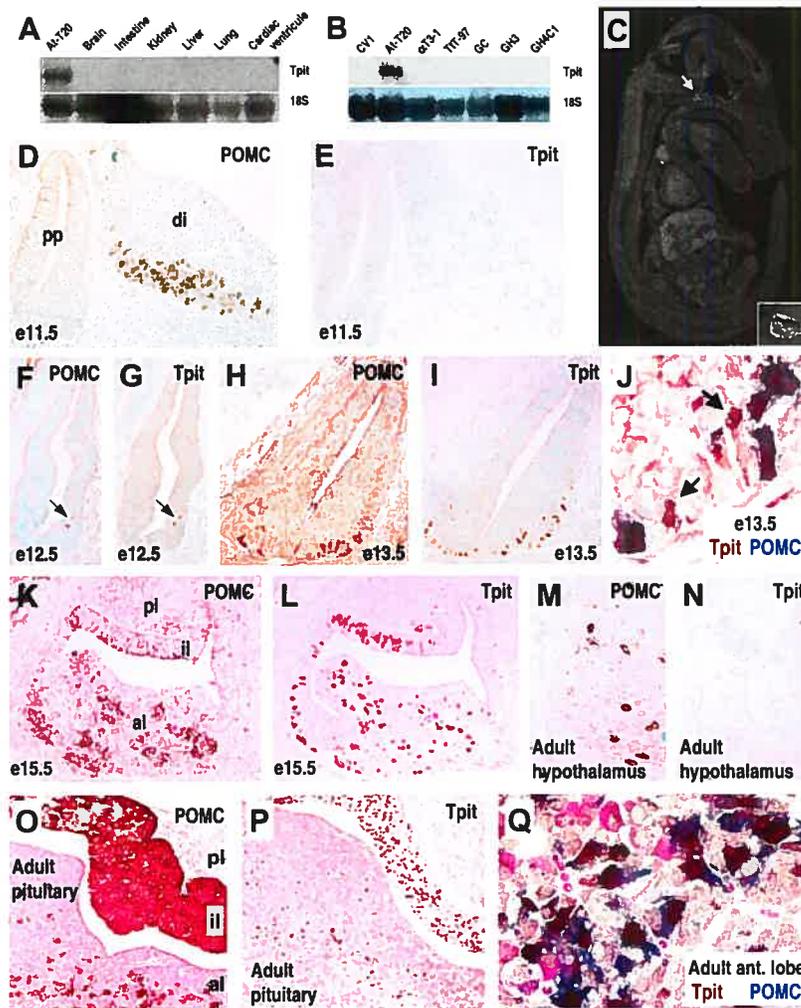


Figure 2.3. Tpit is only expressed in POMC-expressing cells of the pituitary gland. A and B)

The pattern of Tpit expression was studied by Northern blot using total RNA from adult mouse tissues (A) and from cell lines representative of anterior pituitary lineages (B). AtT-20 cells are a model of corticotrophs, α T3-1 of gonadotrophs, TtT-97 of thyrotrophs and GC, GH3 and GH4C1 of somato-lactotrophs. C-Q)

Tpit expression in POMC-expressing tissues was determined by immunohistochemistry. C) Tpit immunoreactivity could only be detected in cell nuclei of the pituitary gland (inset) as shown for a E15.5 whole embryo sagittal section. At e11.5, Tpit (E) was not detected in POMC neurons (D) of the

ventral diencephalon (di) and neither were detected in the pituitary primordium (pp). Tpit was first identified in nuclei of corticotroph POMC cells of the pituitary at e12.5 (F and G; arrows). At e13.5, all corticotrophs (H and J) expressed Tpit (I and J) but some cells only expressed Tpit (indicated by arrows in J): this would be consistent with an earlier onset of Tpit compared to POMC. At e15.5, POMC (K) appeared in intermediate lobe (il) melanotrophs. Tpit was detected in those cells as well as in dispersed cells of the anterior lobe (L). In the adult, POMC is expressed in the arcuate nucleus of the hypothalamus (M) but Tpit was not detected in these POMC neurons (N). In the adult pituitary, Tpit was detected in all nuclei of intermediate lobe melanotrophs (O and P) and only in corticotrophs of the anterior lobe (O, P, and Q). A mouse anti-ACTH antibody was used in (D, F, H, J, K, M, O and Q) to identify POMC-expressing cells and a rabbit anti-Tpit in (E, G, I, J, L, N, P and Q). Sections (C) to (L) are sagittal with the embryo facing to the right. Sections (M) to (Q) are coronal. di, ventral diencephalon; al, anterior lobe, il, intermediate lobe; pl, posterior lobe; pp, pituitary primordium.

ventral diencephalon (di) and neither were detected in the pituitary primordium (pp). Tpit was first identified in nuclei of corticotroph POMC cells of the pituitary at e12.5 (F and G; arrows). At e13.5, all corticotrophs (H and J) expressed Tpit (I and J) but some cells only expressed Tpit (indicated by arrows in J): this would be consistent with an earlier onset of Tpit compared to POMC. At e15.5, POMC (K) appeared in intermediate lobe (il) melanotrophs. Tpit was detected in those cells as well as in dispersed cells of the anterior lobe (L). In the adult, POMC is expressed in the arcuate nucleus of the hypothalamus (M) but Tpit was not detected in these POMC neurons (N). In the adult pituitary, Tpit was detected in all nuclei of intermediate lobe melanotrophs (O and P) and only in corticotrophs of the anterior lobe (O, P, and Q). A mouse anti-ACTH antibody was used in (D, F, H, J, K, M, O and Q) to identify POMC-expressing cells and a rabbit anti-Tpit in (E, G, I, J, L, N, P and Q). Sections (C) to (L) are sagittal with the embryo facing to the right. Sections (M) to (Q) are coronal. di, ventral diencephalon; al, anterior lobe, il, intermediate lobe; pl, posterior lobe; pp, pituitary primordium.

presence in other POMC-expressing cells. Two populations of neurons also express POMC: a transient group of cells in the ventral diencephalon express POMC between e10.5 and e15.5 [(Elkabes et al., 1989); data not shown] and the adult arcuate nucleus contains POMC neurons (Gee et al., 1983). The relationship between these two groups of POMC neurons is currently unclear. Neither of these structures express *Tpit* (Fig. 2.3E and 2.3N) although POMC-derived ACTH could be detected at e11.5 in the ventral diencephalon (Fig. 2.3D) and in the adult hypothalamus (Fig. 2.3M). In summary, we could detect *Tpit* in only two cell types in the developing and adult mouse, the pituitary POMC-expressing corticotrophs and melanotrophs.

2.3.3 *Tpit* and *Pitx1* are jointly required for activation of POMC transcription

The highly restricted *Tpit* expression in POMC cells is consistent with a putative role in control of POMC cell-specific transcription. The requirement for intact binding sites of both *Tpit* and *Pitx1* within the CE3 regulatory element (Fig. 2.1B) suggests that these two factors require each other for transcriptional activity. This was assessed in a reconstitution assay in CV1 cells. Either factor alone showed minimal activity but together they exhibited a strong synergism that was not observed on a reporter devoid of the CE3 response element (Fig. 2.4A). Importantly, the only other T-box factor identified in AtT-20 cells, *Tbx1*, is unable

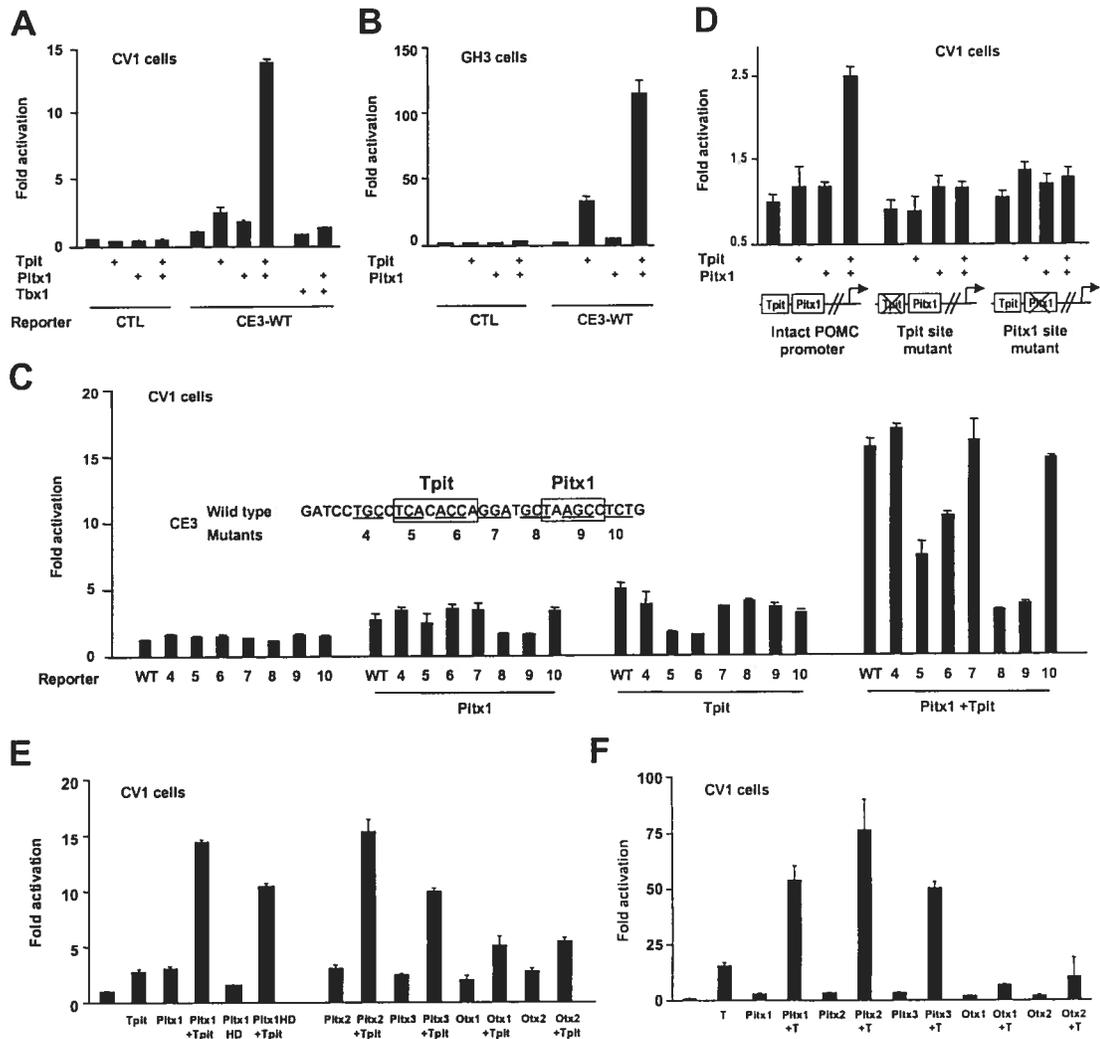


Figure 2.4. Tpit and Pitx1 activate POMC transcription synergistically in heterologous cells. **A)** The activity of Tpit and Tbx1 was tested in CV1 cells using the CE3-WT reporter (Fig. 1B) in presence or absence of Pitx1 as indicated. Fold activation is shown relative to the minimal *POMC* promoter construct (CTL). **B)** Similar experiment as in (A) using GH3 cells which express endogenous *Pitx1*. **C)** Dependence on both Tpit and Pitx1 target sites for synergistic activity of Tpit and Pitx1. The CE3-WT and CE3 mutant reporters (Fig. 1B) were used to assess the effect of each target site (boxed on the sequence showing each mutation) on basal, Pitx1-, Tpit- and (Pitx1+Tpit)-dependent activity. **D)** Importance of Tpit and Pitx1 target sites in intact *POMC* promoter (-480 to +63 bp). Mutagenesis of either target site prevented the synergistic effect of Tpit and Pitx1 on reporter activity. NeuroD1 and Pan1 (E47) were co-expressed in these experiments because these factors are required for *POMC* promoter activity (Fig. 1A). **E)** The Pitx homeodomain is sufficient for enhancement of Tpit-dependent transcription. The related Pitx1/2/3 homeodomain factors, but not Otx1/2, synergize with Tpit. The CE3-WT reporter (Fig. 1B) was co-transfected in CV1 cells together with indicated expression plasmids, including a Pitx1 deletion mutant containing only its homeodomain (Pitx1HD). These vectors produce similar levels of expressed protein (Poulin et al., 2000; Tremblay et al., 1999). **F)** Brachyury (T) synergizes with Pitx, but not Otx, factors.

to synergise with Pitx1 (Fig. 2.4A). Thus only Tpit can mimic in this reconstituted system the properties exhibited by the CE3 element in AtT-20 cells (Fig. 2.1B). Similar results were obtained in pituitary GH3 cells (Fig. 2.4B) that express Pitx1 (Tremblay et al., 1998) but not Tpit (Fig. 2.3B). In these cells, the activity is almost entirely dependent on over-expressed Tpit (Fig. 2.4B). To confirm the site of Tpit action, we used the set of CE3 mutants (Fig. 2.1B) as reporters in CV1 cells. As expected, mutants M5 and M6 could not be activated by Tpit although they were weakly activated by Pitx1 and conversely for mutants M8 and M9, and Pitx1. Thus the Tpit target sequence is indeed the Brachyury binding motif (Fig. 2.1C). As in AtT-20 cells (Fig. 2.1B), activation of the CE3-WT reporter by Pitx1 and Tpit depends on both binding sites in heterologous cells (Fig. 2.4C). The importance of both promoter binding sites was also assessed in the context of the intact *POMC* promoter. Again, the synergistic effect of Tpit and Pitx1 requires both binding sites as mutagenesis of either prevented their action (Fig. 2.4D).

2.3.4 Specificity of cooperation between Pitx and T-box factors

To assess the specificity of *Tpit* and *Pitx1* cooperation, we tested other factors of each gene family. The three known Pitx factors enhanced transcription synergistically with Tpit, whereas the related Otx1 and Otx2 factors only exhibited additive effects (Fig. 2.4E). The three Pitx factors are highly homologous in their HD and much less elsewhere. Consistent with this, we found that the Pitx1

homeodomain on its own (Poulin et al., 2000; Tremblay et al., 1999) was sufficient for synergism with Tpit (Fig. 2.4E). In contrast to Tbx1 which was unable to synergize with Pitx1 (Fig. 2.4A), we found that Brachyury (T) which is most homologous to Tpit, exhibited a very strong transcriptional synergism with the three Pitx factors but not with the related Otx proteins (Fig. 2.4F). Thus, within the large HD and T-box families of transcription factors, members of the Pitx and Brachyury (T) subfamilies can preferentially interact with each other for concerted action on the POMC promoter.

2.3.5 Tpit binds the T-box element

In order to verify that Tpit indeed binds the T element (Fig. 2.1C), we assessed by EMSA the DNA binding properties of a MBP-Tpit fusion protein (Fig. 2.5A). MBP-Tpit bound to the CE3 probe in a dose dependent manner (lane 2-6) and this binding was specific as indicated by competition experiments (Fig. 2.5A). Mutants M4 and M7 (lanes 10 and 13), but not M5 or M6 (lane 11, 12), compete for binding, in support of the conclusion that the Tpit binding site is indeed the Brachyury binding motif. The ability of Tpit and Pitx1 to bind the CE3 probe jointly was next shown by EMSA (Fig. 2.5B). A new complex of slower mobility was observed in presence of both proteins (compare lane 4 with lanes 2 and 3) and formation of this complex was blocked by either Tpit (lane 5) or Pitx1 (lane 6) antisera, but not by control IgGs (lane 7). Thus, Tpit and Pitx1 can bind to their

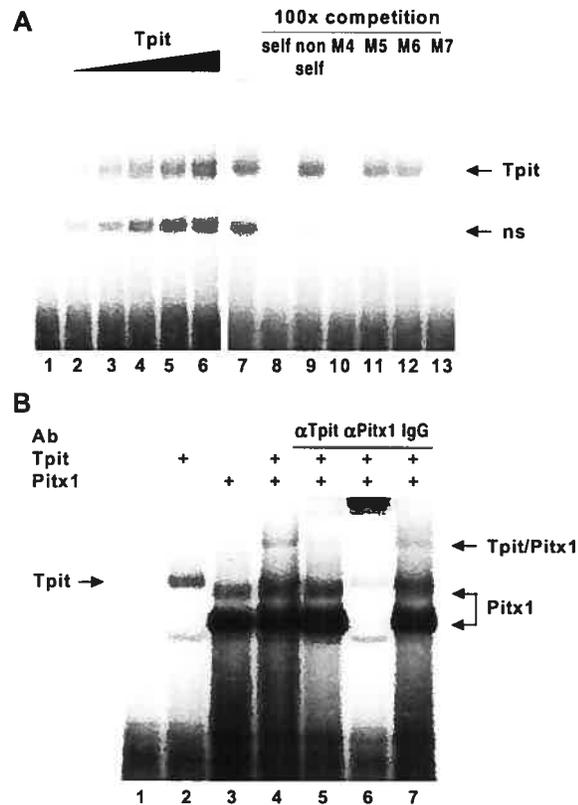


Figure 2.5. Tpit binds to the T-Box element. A) The binding of a MBP-Tpit fusion protein was analyzed by gel retardation. The CE3 probe was either incubated with no protein (lane 1) or increasing amount of MBP-Tpit (200 ng to 1 μ g) (lanes 2-6). The binding was challenged by 100 fold molar excess of the unlabelled CE3 probe (self) (lane 8), unrelated oligomer (non self) (lane 9), active mutants M4 and M7 (lanes 10 and 13) and inactive mutants M5 and M6 (lanes 11 and 12). A non-specific complex of faster mobility (ns) was competed in all cases. **B)** Tpit and Pitx1 form a tri-molecular complex with the CE3 probe. A new slower mobility complex (Tpit/Pitx1) appeared when both Tpit and Pitx1 were present (lane 4) in addition to specific bands in presence of Tpit (lane 2) or Pitx1 (lane 3). This complex was blocked or supershifted in presence of antibodies directed against Tpit (lane 5) or Pitx1 (lane 6) but not by control IgGs (lane 7).

neighbouring binding sites at the same time in agreement with their joint requirement for transcription.

2.3.6 *Tpit* initiates POMC cell differentiation

The highly restricted pattern of *Tpit* expression and its unique ability to activate the POMC gene suggest that it may be a regulator of pituitary differentiation. Since *Tpit* action on POMC transcription requires Pitx proteins (Fig. 2.1B and 2.4) and since we could show *Tpit* action in pituitary GH3 cells that express Pitx proteins (Fig. 2.4B), we set-up a gain-of-function experiment in mice by targeting ectopic expression of *Tpit* in the rostral tip of the early pituitary (Fig. 2.6A, B), a transient structure that appears to only contain uncommitted cells (Nemeskéri et al., 1988) which express high levels of Pitx1 (Lanctôt et al., 1999a). These cells do not express POMC (Fig. 2.6E) but they transiently express the α -glycoprotein subunit (α GSU) and TSH β genes (Lin et al., 1994). A 4.6 kb α GSU promoter fragment was used to target *Tpit* expression (Kendall et al., 1994). At e14.5, five α GSU-*Tpit* founder transgenic embryos showed nuclear *Tpit* staining in their rostral tip (Fig. 2.6D) whereas control non-transgenic littermates did not (Fig. 2.6C). Ectopic expression of *Tpit* appeared sufficient to activate transcription of the POMC gene in cells of the rostral tip as revealed by ACTH immunostaining (compare dotted area in Fig. 2.6F with 2.6E). NeuroD1 is an early marker of corticotroph cells (Poulin et al., 2000) that appears at about the same time as *Tpit*

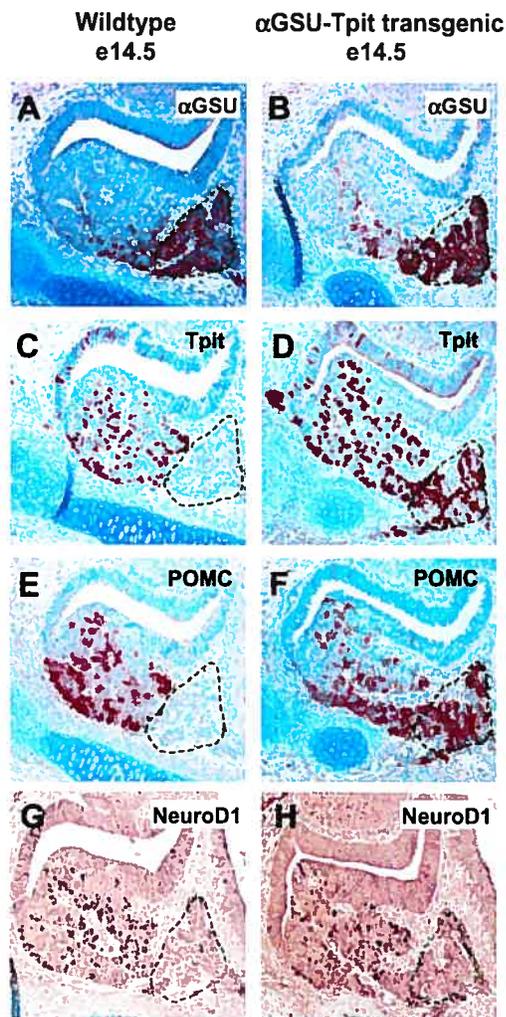


Figure 2.6. POMC cell differentiation induced by *Tpit* in vivo. An α *GSU-Tpit* transgene was used to target ectopic expression of *Tpit* in the rostral tip (delineated by a dashed line) of the developing pituitary gland which expresses high levels of *Pitx1*. At day e14.5, immunoreactive α GSU was mainly expressed in undifferentiated cells of the rostral tip in control (A) and transgenic (B) mice. Immunoreactive *Tpit* or POMC were not detected in the rostral tip of normal pituitaries (C and E, respectively) but were in transgenic pituitaries (D and F). The corticotroph-specific factor *NeuroD1* is not expressed in the rostral tip of either normal (G) or α *GSU-Tpit* transgenic mice (H).

(Fig. 2.3): its expression was not induced in transgenic rostral tip cells that express *Tpit* and POMC (Fig. 2.6G, H). Thus, *Tpit* appears sufficient *in vivo* to initiate POMC cell differentiation, at least as assessed by induction of *POMC* transcription.

2.3.7 TPIT gene mutations in patients with isolated ACTH deficiency

The exclusive expression of *Tpit* in pituitary POMC cells suggests that a loss of *Tpit* function should produce an isolated deficiency of pituitary POMC. In humans, mutations in the *POMC* gene itself (Krude et al., 1998) have been associated with three phenotypes / clinical manifestations (Fig. 2.7A): the absence of hypothalamic POMC is thought to result in obesity because of the role of POMC neurons in the leptin pathway, whereas deficiency in pituitary POMC (ACTH) causes adrenal insufficiency and the absence of dark skin pigments reflects a role of skin POMC. We have analyzed the *TPIT* gene in three children born with isolated deficiency of pituitary ACTH and with the expected secondary adrenal insufficiency. *TPIT* gene mutations were identified in two patients who presented with very similar symptoms, including a sister of the case described by Malpuech et al (1988) and a boy born to consanguineous parents (Fig. 2.7B). The boy had very low basal plasma cortisol, no ACTH response to corticotrophin releasing hormone (CRH) but maintained cortisol response to ACTH administration. The patient (DNA1) was found to be homozygous for a single

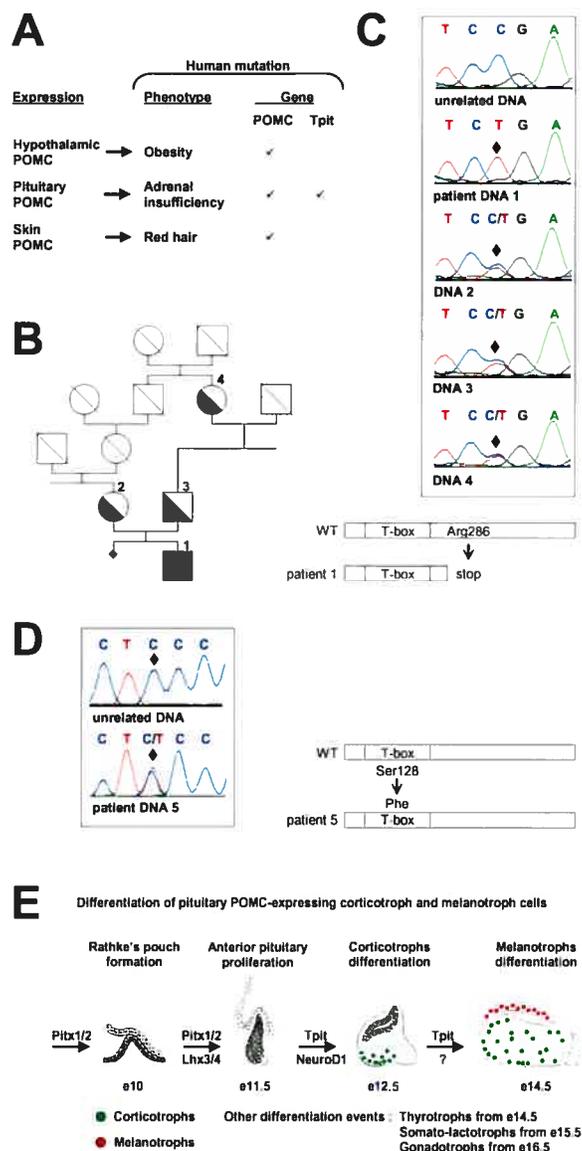


Figure 2.7. Human TPIT gene mutations in isolated pituitary ACTH deficiency. **A)** Comparison of known effects of mutations in human POMC gene with expected phenotype for mutation in TPIT gene. **B)** Pedigree of consanguineous patient (# 1) with isolated pituitary ACTH deficiency. A previous pregnancy had ended in an unexplained neonatal death. **C)** DNA sequence from exon 6 of the *TPIT* gene showing the Arg286→stop mutation (arrowhead) in patient (#1, homozygous) and in parents (# 2, 3, 4, heterozygous) but not in unrelated human DNAs. All exons of the gene were sequenced on both strands and this is the only mutation found. Diagram shows relative position of truncation resulting from introduction of stop codon. **D)** DNA sequence from exon 2 of the *TPIT* gene of another patient showing a Ser128→Phe mutation in the Tbox. This Ser residue is conserved in all known T box genes. **E)** Transcription factors involved in early pituitary development and differentiation. The Pitx1 and Pitx2 factors are co-expressed from e8 of mouse development in the stomodeum, the oral ectoderm epithelium from which Rathke's pouch (RP) forms around e10. Around e11-e11.5, RP has separated from the oral epithelium, formed a glandular structure and these early pituitary cells start to proliferate on the rostro-ventral side. Pitx2 and Lhx3/4 are required for proliferation. From e12.5, the first POMC-expressing corticotroph cells (green) appear ventrally in the anterior pituitary and they co-express Tpit and NeuroD1. Later, around e14.5, POMC-expressing melanotrophs (red) appear in the intermediate pituitary. They express Tpit but not NeuroD1.

nucleotide mutation that introduced a stop codon in the TPIT coding sequences (Fig. 2.7C). This mutation would lead to a truncation of most Tpit C-terminal sequences. The child's parents and one available grandparent, who are not ACTH deficient, were found to be heterozygous for the mutation and this mutation was not found in DNA of any other subject. Thus, the Tpit C-terminal truncation mutation is associated with a loss of pituitary ACTH (POMC) function in a recessive manner. A different TPIT gene mutation was found for the sister of the case described by Malpuech et al (1988): indeed, this patient was found to be heterozygous for a single nucleotide change in exon 2 (Fig. 2.7D) that would lead to the replacement by a phenylalanine of serine residue 128 which is conserved in the T domain of all known Tbox genes. Since no other mutations were found in exon sequences of this patient's TPIT gene, the reasons for her apparent loss-of-function will require further investigation: the Ser→Phe Tpit mutant protein may be a dominant negative form that hampers Tpit function or alternatively, a regulatory mutation may exist in promoter / enhancer sequences of the other TPIT allele. Taken together, the association of these two different TPIT gene mutations with an isolated deficiency of pituitary ACTH is consistent with the purported role of Tpit in differentiation of the pituitary POMC lineage.

2.4 DISCUSSION

It was postulated long ago that pituitary lineage commitment may depend on signaling interactions between sequentially differentiating cells, in addition to epithelium-mesenchyme interactions. In this context, the best candidates for providing initial differentiation cues to other pituitary cells would be POMC-expressing corticotrophs that first reach terminal differentiation (Fig. 2.7E). Current knowledge supports the idea that differentiation of corticotrophs is under quite different mechanisms by comparison to other pituitary lineages (see Introduction). The identification of *Tpit*, a highly restricted factor capable of initiating POMC cell differentiation and of activating POMC transcription, provides the first molecular marker to investigate the origin of corticotrophs.

2.4.1 T-box genes, *Tpit* and cell differentiation

The growing family of T-box genes includes many that have been associated with patterning roles during development (Smith, 1999). Only one T-box factor has thus far been clearly associated with terminal cell differentiation. The T-bet gene directs naive T helper cells into the Th1 differentiation pathway and represses the opposing Th2 differentiation marker (Szabo et al., 2000). The mechanism by which T-bet activates Th1-specific genes and represses Th2-specific genes is presently unknown.

Tpit is also lineage-restricted (Fig. 2.3); it activates transcription of the hallmark gene for corticotrophs, POMC, and it does so through an obligate cooperation with a tissue-restricted homeodomain transcription factor, Pitx1 (Fig. 2.4). *In vivo* ectopic expression of Tpit in uncommitted pituitary cells activated the POMC gene (Fig. 2.6) and human TPIT gene mutations were found in patients with isolated deficiency of pituitary ACTH (Fig. 2.7), in support of an essential role in differentiation of the pituitary POMC lineage. The association of TPIT mutations with a loss of pituitary POMC function (and no other phenotype) supports the idea that the human factor is as restricted in its expression as the mouse factor (Fig. 2.3). In this respect, the data on early expression of chick TbxT at gastrulation (Knezevic et al., 1997) might be taken to suggest that ch-TbxT is not truly an orthologue of mouse and human Tpit since their expression patterns appear clearly different.

Corticotroph differentiation may require other transcription factor(s) in addition to Tpit. There are very few early markers of corticotrophs and NeuroD1 is the only one that is as early as Tpit [(Poulin et al., 2000) and Fig. 2.3F, G]. The inability of Tpit to activate NeuroD1 expression in gain-of-function experiments may indicate that separate pathways induce each corticotroph-specific factor. Although NeuroD1 may not be essential for corticotroph differentiation, we have previously shown the *in vivo* dependence of POMC transcription on upstream

promoter sequences and the Ebox_{neuro} target sequence of bHLH heterodimers (Poulin et al., 2000). Rostral tip cells express high levels of Pitx1 (Lanctôt et al., 1999a) but they do not express NeuroD1 (Fig. 2.6G). Since corticotroph expression of NeuroD1 is itself transient (from e12 to e15), it cannot be excluded that another neurogenic bHLH may be expressed in rostral tip cells, either constitutively or in response to Tpit. In melanotrophs, Pitx1 and Tpit are co-expressed but not NeuroD1 [Fig. 2.3 and (Lanctôt et al., 1999a; Poulin et al., 2000)]. Since the distal sequences of the POMC promoter containing the NeuroD1 target sequence (E box_{neuro}) are also important for POMC expression in melanotrophs (Poulin et al., 2000), it is likely that different transcription factors are involved in melanotroph-specific expression by comparison to corticotroph; they remain to be identified (Fig. 2.7E).

The presence of Tpit and Pitx1 in pituitary POMC-expressing cells and their absence in hypothalamic POMC cells strengthens the idea that these two populations of cells are different. Further, POMC transcription is controlled through different mechanisms in these tissues: transgenic promoter studies have indeed implicated sequences between -13 and -2 kb for hypothalamic POMC expression (Rubinstein et al., 1993; Young et al., 1998) whereas the proximal 480 bp promoter is sufficient for pituitary expression (Hammer et al., 1990; Tremblay et al., 1988).

2.4.2 Cooperation between Tpit and Pitx1

POMC transcription requires both Tpit and Pitx for activity as exemplified by the loss of activity after mutagenesis of either Tpit or Pitx1 binding sites, whether this is tested with isolated CE3 regulatory elements in AtT-20 cells (Fig. 2.1B), in a reconstituted heterologous system (Fig. 2.4A, C) or with the intact promoter (Fig. 2.4D). The proximity of the two binding sites (Fig. 2.1B) taken together with the concurrent binding of the two proteins (Fig. 2.5B) suggests that Tpit and Pitx1 interact with each other. This was supported by *in vitro* pull-down experiments (data not shown) and by the fact that the abundance of complexes that contain both Tpit and Pitx1 in gel shifts (Fig. 2.5B, lane 4) is greater than expected by simple mass action, as would be expected of cooperative binding due to protein interactions.

The Pitx1 HD appeared sufficient for transcriptional synergism with Tpit (Fig. 2.4E). This suggests that, at least in the context of simple reporters, transcriptional activity is mostly contributed by Tpit since the Pitx1 transactivation domains have been previously mapped to the deleted N- and C-termini (Tremblay et al., 1999). Thus, interaction between the Pitx1 HD and Tpit may enhance the stability of complex formation between the two proteins and DNA and/or it may induce a conformational change in Tpit to enhance its transactivation function. The Pitx1 HD is also sufficient for interaction with its other transcriptional partner in

the POMC promoter, namely the bHLH domain of Pan1 (E47) which heterodimerizes with NeuroD1 [Fig. 2.1A and (Poulin et al., 2000)]. Since the three factors (Tpit, Pitx1 and bHLH dimers) enhance transcription synergistically in a reconstituted system (Fig. 2.4D and data not shown), it is likely that different residues of the Pitx1 HD mediate concurrent interactions with Tpit and bHLH factor dimers [as discussed in (Poulin et al., 2000)]. These HD-mediated interactions are very different by comparison to another set of Pitx1-interacting transcription factors, namely SF-1 and Egr1 which both interact on the LH β promoter with protein sequences of the Pitx1 C-terminus (Tremblay et al., 1999; Tremblay and Drouin, 1999).

Transcriptional synergism between HD and T-box factors appears to be restricted to the Pitx1 subfamily of HD proteins and even the most closely related HD subfamily, the Otx proteins, do not exhibit synergism with either Tpit (Fig. 2.4E) or with T (Fig. 2.4F). Within the T-box family, it is interesting that T itself which is most closely homologous to Tpit was also able to synergize the Pitx factors but that Tbx1, which is coexpressed with Tpit in AtT-20 cells, is unable to do so (Fig. 2.4A and F). The specificity of this molecular interaction may have unique functions during development in tissues where Pitx- and T-related transcription factors are coexpressed.

2.4.3 Developmental significance of interaction between Pitx and T-box transcription factors

The recent implication of a Pitx gene, Pitx2, and a T-box gene, Tbx5, in cardiac morphogenesis, and of Pitx1 and Tbx4 in a common pathway for specification of the hindlimb identity, suggests that the joint developmental roles of these factors may require their concerted action on downstream target genes. Indeed, Pitx2^{-/-} mice (Gage et al., 1999b; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999) and Holt-Oram patients (Basson et al., 1997; Li et al., 1997) who carry mutations in the TBX5 gene, both have heart septation defects. Pitx1 (Lancôtôt et al., 1997) and Tbx4 (Chapman et al., 1996) are both specifically expressed in hindlimbs (but not in forelimbs) and Pitx1^{-/-} mice develop hindlimbs with forelimb-like features (Lancôtôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999) whereas ectopic expression of Pitx1 or Tbx4 in chick wing buds partially transforms them into limbs that have leg features (Logan and Tabin, 1999; Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). Although Pitx1 appears to be upstream of Tbx4 in a cascade of genes required for hindlimb specification, neither gene produced a complete change of limb identity in these experiments and it is possible that both factors work together on downstream target genes. It will be interesting to determine whether the paradigm outlined in the present work for the joint action of Pitx and T-box factors may also apply in limbs.

2.4 Experimental procedures

2.4.1 Cell culture and transient transfection assays

AtT-20, GH3 and CV1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum. AtT-20 and GH3 cells were electroporated (Lamonerie et al., 1996) or lipofected (Poulin et al., 2000) as described previously. CV1 cells were transfected by the calcium phosphate method using 1.5 μg reporter plasmid, 0-2 μg of effector plasmid, 0.5 μg of RSV-GH or 20 ng of CMV- β -galactosidase as internal controls, and carrier DNA up to a total of 5 μg per assay. 16 hr after transfection of 5×10^4 cells in 12 wells dishes, medium was changed, and cells were harvested 24 hr later.

2.4.2 Plasmids and oligonucleotides

Reporter plasmids were constructed by cloning three copies of wild-type or mutant CE3 oligonucleotides at the *Bam*HI site of a pXP1-derived vector containing the minimal *rPOMC* promoter (-34 to +63 bp) as described previously (Lamonerie et al., 1996). Mutants M7 and M8 of the present work are identical to mutants M1 and M2 described in (Lamonerie et al., 1996). The Tpit, T and Tbx1 expression plasmids were constructed in the same expression vector as previously used for Pitx factors, including the Pitx1 N- and C- termini deletion mutant

(Tremblay et al., 1999). The maltose binding protein (MBP)-*Tpit* fusion protein was constructed by subcloning a 1350 bp PCR fragment into the *Pst*I site of the pMal-c vector (New England Biolabs).

2.4.3 RNA analysis, degenerate PCR and cDNA library screening

Total RNA was extracted and analyzed by Northern blot as described previously (Lamonerie et al., 1996). For RT-PCR, 5 µg AtT-20 cell RNA was used for cDNA synthesis with AMV reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions contained 200 ng of cDNA, 50 pmoles of each primer, 200 µM dNTPs, 2 µl DMSO, 5 µl X Thermopol buffer (NEB), 1 U Vent polymerase (NEB), and water up to 50 µl. Degenerate primers were designed from an alignment murine T-box sequences (Fig. 2.2C): primer 1 : GG(ACG)AGG(AC)G(ACG)ATGTT(CT)CC, primer 2 : TTCTGGTAGG(AC)AGT(CG)AC(AGT)G. The PCR reaction was run for 30 cycles of 94°C, 1 minute; 52°C, 1 minute; 72°C, 1 minute. PCR fragments of the expected length (~400 bp) were separated by PAGE, purified using Qiaex II (Qiagen), cloned and sequenced. We used the 398 bp *Tpit* PCR fragment to screen an AtT-20 cDNA library cloned in phage λgt11. About 60 positive clones were identified from the 4×10^5 pfu screened.

2.4.4 Gel retardation assay

The MBP-Tpit fusion protein was produced and purified according to the manufacturer's protocol (NEB). Binding reactions (Lamonerie et al., 1996) were performed using ~ 4 fmoles (~ 50 000 cpm) of 5' end-labeled oligonucleotide probes and 200 ng to 1 µg of MBP-Tpit and/or 20 ng of MBP-Pitx1. For supershift experiments, antibodies were added to the mix during the last 20 minutes of the incubation. Samples were run for 2.5 hr at 200V on 5% polyacrylamide gel in 80 mM Tris-HCl/390 mM glycine (pH 8.5) at 4°C.

2.4.5 Preparation and characterization of affinity-purified anti-Tpit antibodies

Antibodies were raised in rabbits using 100 µg purified MBP-Tpit for the primary injection and three subsequent boosts. Affinity purification was performed as previously described (Lanctôt et al., 1999a) except that a GST-Tpit column was used. Two different antisera were produced against different antigens, one containing the entire Tpit sequence whereas the other only used a 102 amino acids fragment of the Tpit C-terminus. Both antisera produced similar results (not shown).

2.4.6 Immunohistochemistry, section and wholemount *in situ* hybridization

Immunohistochemistry was performed as described (Lanctôt et al., 1999a). POMC and Tpit immunoreactivities were detected with a mouse antibody against N-terminal ACTH (Cortex Biochem, at 5 µg/ml) and anti-mouse IgG used with horseradish peroxidase or alkaline phosphatase, and with a rabbit anti-Tpit IgG (1:200) and anti-rabbit IgG used with horseradish peroxidase, respectively. Section (Lanctôt et al., 1997) and whole mount (Belo et al., 1997) *in situ* hybridizations were performed as described.

2.4.7 Generation of transgenic mice

The 4.6 kb α GSU promoter was inserted upstream of Tpit coding sequences followed by the SV40 polyA region. Transgenic mice were produced as described (Poulin et al., 2000). Umbilical cord DNA of e14.5 embryos was used for genotyping by PCR using a 22 bp forward oligo in the α GSU promoter (5' GGTAGAATTTACCCCTGATCCC 3') and a 22 bp reverse oligo in Tpit coding sequences (5' TCACTTTGCTGAAGGAGATGGG 3').

2.4.8 Analysis of human TPIT gene

Direct DNA sequencing was carried out on both strands of PCR amplified DNA from all exons of the TPIT gene. Internal primers were used for sequencing relative to PCR primers. For exon 6 (Fig. 2.7C), PCR primers were : 5' CAGAATTCAGGCTCCTCTATGC 3' and 5' GATGAGCTGAGTGTTTCAGACC 3', and sequencing primer was 5' TCCAGAGAAGCCAAGTTAGC 3'.

2.5 Acknowledgements

We are grateful to Profs. Michel David, Lyon, and Georges Malpuech, Clermont-Ferrand, for referring the ACTH deficiency patients. We thank our colleagues Marc Therrien and Guy Sauvageau for critical reading of the manuscript, Sally Camper and David Gordon for the α GSU promoter plasmid. We thank Gino Poulin for NeuroD1 immunohistochemistry, Jacques J. Tremblay for pituitary cell line RNA, as well as G. Poulin and Mélanie Lebel for the POMC promoter mutants of the Pitx1 and Tpit sites. We are grateful for the efficient help of Qinzhang Zhu and Michel Robillard at the IRCM Transgenic Facility, of Marco Raposo at the IRCM sequencing facility, and of Claire Crevier for preparation of histology sections. We thank Lise Laroche for secretarial help and the NIH National Hormone and Pituitary Program for providing the α GSU antiserum. B.L.

and A.M.P. are recipients of studentships from the Medical Research Council of Canada (MRC) and National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), respectively. This work was supported by a grant of the National Cancer Institute of Canada to J.D. with funds provided by the Canadian Cancer Research Society.

2.6 References

- Basson,C.T., Bachinsky,D.R., Lin,R.C., Levi,T., Elkins,J.A., Soultis,J., Grayzel,D., Kroumpouzou,E., Traill,T.A., Leblanc-Straceski,J., Renault,B., Kucherlapati,R., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* *15*, 30-35.
- Belo,J.A., Bouwmeester,T., Leyns,L., Kertesz,N., Gallo,M., Follettie,M., and De Robertis,E.M. (1997). Cerberus-like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech. Dev.* *68*, 45-57.
- Bodner,M., Castrillo,J.L., Theill,L.E., Deerinck,T., Ellisman,M., and Karin,M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* *55*, 505-518.
- Chapman,D.L., Garvey,N., Hancock,S., Alexiou,M., Agulnik,S.I., Gibson-Brown,J.J., Cebra-Thomas,J., Bollag,R.J., Silver,L.M., and

- Papaioannou,V.E. (1996). Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev. Dynamics* 206, 379-390.
- Dasen,J.S., O'Connell,S.M., Flynn,S.E., Treier,M., Gleiberman, AS, Szeto,D.P., Hooshmand,F., Aggarwal,A.K., and Rosenfeld,M.G. (1999). Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97, 587-598.
- Drouin,J., Lamolet,B., Lamonerie,T., Lanctôt,C., and Tremblay,J.J. (1998). The *Ptx* family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140, 31-36.
- Elkabes,S., Loh,Y.P., Nieburgs,A., and Wray,S. (1989). Prenatal ontogenesis of pro-opiomelanocortin in the mouse central nervous system and pituitary gland: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Dev. Brain Res.* 46, 85-95.
- Gage,P.J. and Camper,S.A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* 6, 457-464.
- Gage,P.J., Suh,H., and Camper,S.A. (1999a). The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm. Genome* 10, 197-200.
- Gage,P.J., Suh,H.Y., and Camper,S.A. (1999b). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126, 4643-4651.
- Gee,C.E., Chen,C.L.C., Roberts,J.L., Thompson,R., and Watson,S.J. (1983). Identification of pro-opiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306, 374-376.

- Hammer,G.D., Fairchild-Huntress,V., and Low,M.J. (1990). Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 4 , 1689-1697.
- Ikeda,Y., Luo,X., Abbud,R., Nilson,J.H., and Parker,K.L. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9, 478-486.
- Ingraham,H.A., Chen,R., Mangalam,H.J., Elsholtz,H.P., Flynn,S.E., Lin,C.R., Simmons,D.M., Swanson,L., and Rosenfeld,M.G. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55, 519-529.
- Ingraham,H.A., Lala,D.S., Ikeda,Y., Luo,X., Shen,W.H., Nachtigal,M.W., Abbud,R., Nilson,J.H., and Parker,K.L. (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* 8, 2302-2312.
- Japon,M.A., Rubinstein,M., and Low,M.J. (1994). In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1117-1125.
- Kendall,S.K., Gordon,D.F., Birkmeier,T.S., Petrey,D., Sarapura,V.D., O'Shea,K.S., Wood,W.M., Lloyd,R.V., Ridgway,E.C., and Camper,S.A. (1994). Enhancer-mediated high level expression of mouse pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit transgene in thyrotropes,

- gonadotropes, and developing pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* *8*, 1420-1433.
- Kioussi,C., Carriere,C., and Rosenfeld,M.G. (1999). A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mech. Dev.* *81*, 23-35.
- Kispert,A. and Hermann,B.G. (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* *12*, 4898-4899.
- Knezevic,V., De Santo,R., and Mackem,S. (1997). Two novel chick T-box genes related to mouse Brachyury are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development* *124*, 411-419.
- Krude,H., Biebermann,H., Luck,W., Horn,R., Brabant,G., and Gruters,A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* *19* , 155-157.
- Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctôt,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* *10*, 1284-1295.
- Lanctôt,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999a). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* *140*, 1416-1422.
- Lanctôt,C., Lamolet,B., and Drouin,J. (1997). The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* *124*, 2807-2817.

- Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999b). Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* 126, 1805-1810.
- Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.
- Li,Q.Y., Newbury-Ecob,R.A., Terrett,J.A., Wilson,D.I., Curtis,A.R., Yi,C.H., Gebuhr,T., Bullen,P.J., Robson,S.C., Strachan,T., Bonnet,D., Lyonnet,S., Young,I.D., Raeburn,J.A., Buckler,A.J., Law,D.J., and Brook,J.D. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat. Genet.* 15, 21-29.
- Lin,C.R., Kloussi,C., O'Connell,S., Briata,P., Szeto,D., Liu,R., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401, 279-282.
- Lin,S.C., Li,S., Drolet,D.W., and Rosenfeld,M.G. (1994). Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1- independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* 120, 515-522.
- Logan,M. and Tabin,C.J. (1999). Role of *Pitx1* upstream of *Tbx4* in specification of hindlimb identity. *Science* 283, 1736-1739.
- Lu,M.F., Pressman,C., Dyer,R., Johnson,R.L., and Martin,J.F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 401, 276-278.

- Maira,M.H., Martens,C., Philips,A., and Drouin,J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7549-7557.
- Malpuech,G., Vanlieferinghen,P., Dechelotte,P., Gaulme,J., Labbe,A., and Guiot,F. (1988). Isolated familial adrenocorticotropin deficiency: prenatal diagnosis by maternal plasma estriol assay. *Am. J. Med. Genet.* *29*, 125-130.
- Naya,F.J., Stellrecht,C.M.M., and Tsai,M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* *9*, 1009-1019.
- Nemeskéri,A., Sétalo,G., and Halasz,B. (1988). Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. *Neuroendocrinol.* *48*, 534-543.
- Poulin,G., Lebel,M., Chamberland,M., Paradis,F.W., and Drouin,J. (2000). Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4826-4837.
- Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6673-6682.
- Rodriguez-Esteban,C., Tsukui,T., Yonei,S., Magallon,J., Tamura,K., and Izpisua Belmonte,J.C. (1999). The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* *398*, 814-818.
- Rubinstein,M., Mortrud,M., Liu,B., and Low,M.J. (1993). Rat and mouse proopiomelanocortin gene sequences target tissue-specific expression to

the pituitary gland but not to the hypothalamus of transgenic mice. *Neuroendocrinol.* *58*, 373-380.

Sheng,H.Z., Moriyama,K., Yamashita,T., Li,H., Potter,S.S., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1997). Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* *278*, 1809-1812.

Sheng,H.Z. and Westphal,H. (1999). Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet.* *15*, 236-240.

Smith,J. (1999). T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet.* *15*, 154-158.

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

Szabo,S.J., Kim,S.T., Costa,G.L., Zhang,X., Fathman,C.G., and Glimcher,L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655-669.

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

- Szeto,D.P., Ryan,A.K., O'Connell,S.M., and Rosenfeld,M.G. (1996). P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 7706-7710.
- Takeuchi,J.K., Koshiba-Takeuchi,K., Matsumoto,K., Vogel-Hopker,A., Naitoh-Matsuo,M., Ogura,K., Takahashi,N., Yasuda,K., and Ogura,T. (1999). Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* *398*, 810-814.
- Tremblay,J.J. and Drouin,J. (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone α gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2567-2576.
- Tremblay,J.J., Goodyer,C.G., and Drouin,J. (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol.* *71* , 277-286.
- Tremblay,J.J., Lanctôt,C., and Drouin,J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol. Endocrinol.* *12*, 428-441.
- Tremblay,J.J., Marcil,A., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999). Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* *18*, 3431-3441.
- Tremblay,Y., Tretjakoff,I., Peterson,A., Antakly,T., Zhang,C.X., and Drouin,J. (1988). Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *85*, 8890-8894.

Young, J.I., Otero, V., Cerdan, M.G., Falzone, T.L., Chan, E.C., Low, M.J., and Rubinstein, M. (1998). Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J. Neurosci.* *18*, 6631-6640.

Chapitre 3

**TPIT-INDEPENDENT FUNCTION OF
NEUROD1(BETA2) IN PITUITARY
CORTICOTROPH DIFFERENTIATION**

Autres collaborateurs :

Gino Poulin, Khoi Chu, François Guillemot, Ming-Jer Tsai et

Jacques Drouin

Publié dans *Molecular Endocrinology* 18 (4) : 995-1003, 2004

3.1 Abstract

NeuroD1(BETA2) and Tpit are cell-specific activators of pituitary proopiomelanocortin (POMC) gene transcription. Expression of both factors slightly precedes that of POMC at e12.5 of mouse pituitary development. We now report that NeuroD1(BETA2) is required for early corticotroph differentiation. In agreement with the transcriptional synergism observed between Tpit and bHLH dimers containing NeuroD1(BETA2), POMC expression is delayed in NeuroD1-deficient mice. However, this differentiation defect does not reflect a change of corticotroph commitment as revealed by Tpit expression. The delay of corticotroph terminal differentiation is transient and coincides with the developmental window of NeuroD1 expression in corticotrophs. In contrast to their requirement in other NeuroD1-expressing cells, the neurogenin genes do not appear to be necessary for corticotroph differentiation. Taken together with a similar requirement of Tpit for corticotroph differentiation but not for commitment, the present data indicate that the POMC promoter is a point of convergence for independent corticotrophs differentiating signals.

3.2 Introduction

During mammalian pituitary gland development, the first functional hormone-producing cells to differentiate are the corticotrophs that appear at e12.5 in the ventral part of the mouse pituitary (1). The molecular mechanisms that

regulate this differentiation are being unraveled, particularly by identification of transcription factors controlling various aspects of organogenesis and/or cell differentiation. Homeobox transcription factors Pitx1 and 2 are both expressed early in the oral ectoderm and its derivative, Rathke's pouch, which develops into the pituitary gland (2;3). Inactivation of the Pitx2 gene blocks cell proliferation and differentiation of all lineages in the pituitary primordium, except corticotrophs (4-6). A similar phenotype was observed after knock out of the Lhx3 gene (7), which appears to be under control of Pitx genes (8;9). This suggests that determination of corticotroph progenitors occurs early and/or in a significantly different way by comparison to those of other pituitary lineages.

Recent work identified early signals that may influence corticotroph differentiation. *Ex vivo* experiments performed with tissues obtained at early stages of pituitary development indicated that FGF8 and BMP2/4 block corticotroph differentiation (10). However, ectopic expression of these factors in transgenic mice suggested otherwise (11). Another approach to identify mechanisms of corticotroph differentiation has been through analysis of tissue-specific mechanisms for POMC gene regulation. This led to the identification of two corticotroph-specific regulators, the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor NeuroD1(BETA2) (12;13) and the T-box factor Tpit (14;15). NeuroD1(BETA2) is a class B bHLH expressed in pancreas, intestine (16;17), various parts of the nervous system (18) and in the pituitary corticotroph lineage (12;13). Other class B bHLH factors were shown to be required for differentiation

of muscle cells (19), the hematopoietic system (20) and neurons (21). In corticotrophs, the NeuroD1 protein was only detected between e12,0 and e15.5 although mRNA is still detectable in the adult gland (13). For transcriptional activation, NeuroD1 heterodimerizes with ubiquitous class A bHLH, such as E47(Pan1), and these heterodimers bind to a specific E box, the E-box_{neuro}, within the POMC promoter to activate transcription. This transcriptional effect is enhanced synergistically by physical and functional interaction with Pitx1(12;13).

The other corticotroph marker Tpit (Tbx19) was identified as an obligate partner of Pitx1 for activation of POMC transcription (14). Tpit binds to a T element situated next to the Pitx1 binding site. T-box factors have been involved in differentiation in various tissues such as embryonic mesoderm (22), neural cortex (23) and T helper cells (24). Tpit is only expressed in the two POMC-expressing lineages of the pituitary gland, the corticotrophs and the melanotrophs (14). As for NeuroD1, the onset of Tpit expression in corticotrophs is around e12, just before POMC itself.

This strikingly restricted expression pattern suggested that Tpit may have a role in corticotroph differentiation. This is indeed the case since Tpit-deficient mice fail to terminally differentiate corticotrophs and melanotrophs although early corticotroph commitment appeared to be intact as assessed by NeuroD1 expression (15). In addition, Tpit was shown to have a negative role for gonadotroph differentiation through antagonism with the gonadotroph-restricted orphan nuclear

receptor SF1 (15). The loss of *Tpit* function also results in ACTH deficiency in mice and human TPIT gene mutations are the most frequent cause for early onset isolated ACTH deficiency (14;25).

Gain-of-function experiments in transgenic mice, using the α GSU promoter to drive *Tpit* expression in undifferentiated cells of the rostral tip of the developing pituitary gland, showed that this factor could induce ectopic expression of POMC (14). However, these cells do not express NeuroD1 and do not lead to long-term establishment of corticotrophs. Therefore, *Tpit* appears to be required but not sufficient for complete corticotroph differentiation. NeuroD1 is an obvious candidate for involvement in corticotroph differentiation.

In this paper, we used NeuroD1-deficient mice to show that NeuroD1 is required for proper onset of corticotroph differentiation. This process appears independent of *Tpit* expression. Thus, independent signals appear to control *Tpit* and NeuroD1 expression and appear to converge at the transcriptional level for activation of POMC expression and terminal corticotroph differentiation.

3.3 Results

NeuroD1/Pan1 and *Tpit* are both corticotroph-specific transcriptional activators of the POMC gene and they interact individually with Pitx1. Indeed, the

NeuroD1/Pan1 heterodimers synergistically enhance transcription with Pitx1 and this appears to result from direct physical interactions between the Pitx1 homeodomain and the bHLH domain of Pan1, but not that of NeuroD1 (13). NeuroD1 is nonetheless required because it is essential for specific DNA sequence recognition of the E-box_{neuro}. Similarly, Tpit enhances transcription synergistically with Pitx1 and this results from cooperative DNA binding of the two proteins to their contiguous sites on the POMC promoter (14).

3.3.1 Synergism and physical interactions between bHLH factors and Tpit

In order to assess whether both corticotroph-specific factors act in synergism on POMC transcription, we used a reconstitution system by cotransfection in CV1 cells of a POMC promoter luciferase reporter together with relevant transcription factors (Fig. 3.1A). As shown in Figure 3.1A, Tpit and NeuroD1/Pan1 exert Pitx1-dependent synergism on the POMC reporter. This synergism was also observed on an artificial promoter containing two copies of the E-box_{neuro} and three of the Pitx1-Tpit binding site in GH3 cells which express endogenous Pitx1 (Fig. 3.1B). Since previous work had shown physical interaction between Pitx1 and Pan1 (13), and between Tpit and Pitx1 [(14) and unpublished data], we tested the possibility of a physical interaction between Tpit and HLH factors. In vitro pull-down assays showed that Tpit could only interact

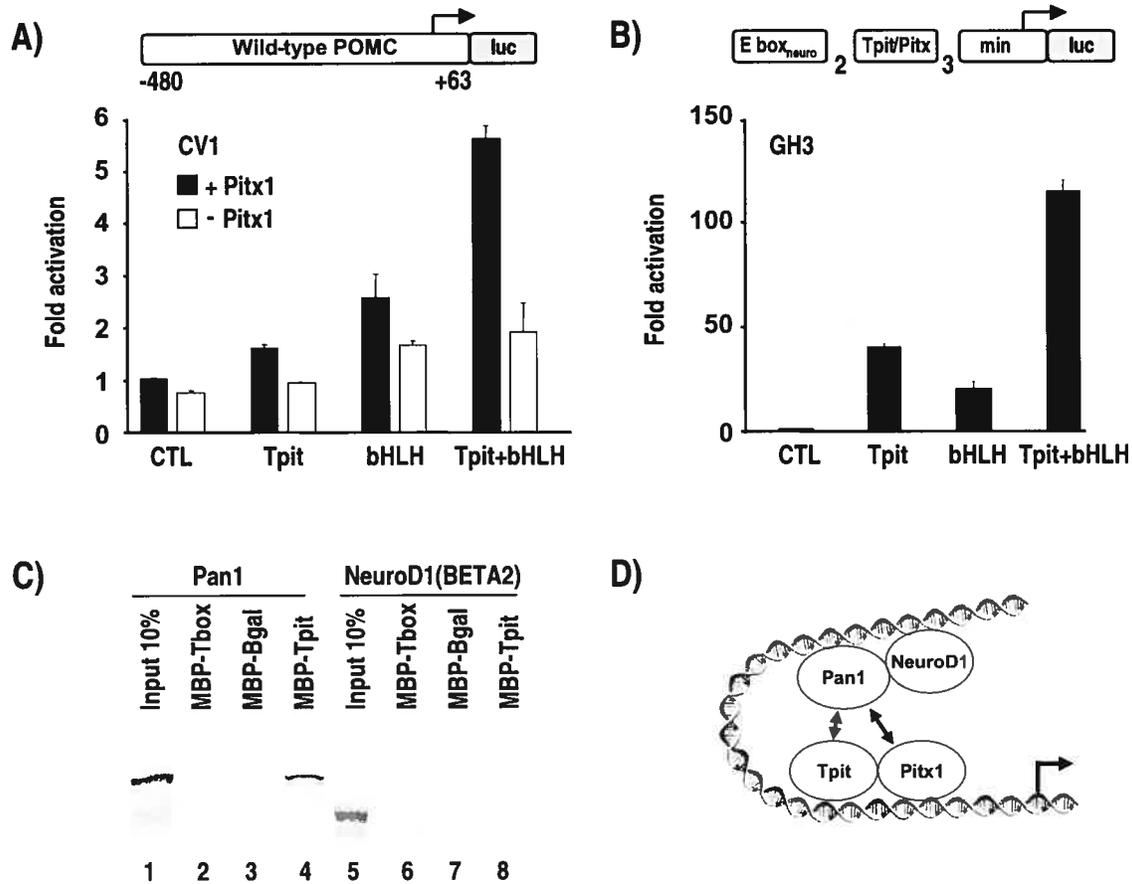


Figure 3.1. Tpit and Pan1/NeuroD1 heterodimers interact to activate POMC transcription. **A)** Tpit and Pan1/NeuroD1 heterodimers (bHLH) activate POMC transcription synergistically in CV1 cells using the POMC promoter (-480 to +63 bp) reporter. Fold activation is shown relative to the POMC promoter construct (CTL) in presence of Pitx1. The homeobox factor Pitx1 was required for synergism between Tpit and bHLH. **B)** Synergism was also observed in GH3 cells that express endogenous Pitx1. **C)** Tpit interacts with Pan1 *in vitro*. Pull-down assays were performed with *in vitro*-synthesized Pan1 or NeuroD1 and purified MBP- β Gal, MBP-Tpit or MBP-T-box of Tpit. Input was 10% of amount used. **D)** Protein interactions of the bHLH heterodimers NeuroD1/Pan 1 with Tpit and Pitx. NeuroD1 provides DNA binding specificity to the bHLH dimers for recognition of the Ebox_{neuro} (12) and these heterodimers interact with Pitx (13) and Tpit (this paper) through Pan1.

with Pan1 (Fig. 3.1C, lane 4) but not NeuroD1 (lane 8). Interestingly, Pan1 did not interact with the T-box of Tpit (lane 2), suggesting that the interaction domain of Tpit with HLH factors is located outside the T-box. The transcriptional synergism between bHLH factors and Tpit/Pitx therefore relies on protein:protein interactions that focus on Pan1; the contribution of NeuroD1 to cell-specific transcription thus depends entirely on its DNA binding specificity for the Ebox_{neuro} (Fig. 3.1D).

3.3.2 Requirement for NeuroD1 in corticotroph differentiation

We already showed that ectopic expression of Tpit could induce POMC expression but not that of NeuroD1, suggesting that Tpit is not upstream of NeuroD1. Also, inactivation of these genes has different consequences. Tpit-null mice have very few corticotroph cells (15) but NeuroD1-null pituitaries contain a normal number of corticotrophs at e17.5 (26). Tpit thus seems essential for corticotroph differentiation but not NeuroD1. However, NeuroD1 protein is not detectable in the late developing pituitary (13).

In order to address a putative role of NeuroD1 on Tpit and/or corticotroph differentiation during early pituitary development, we assessed the onset of corticotroph differentiation in mouse mutants for NeuroD1 (27). Since NeuroD1 is only detectable in corticotrophs between e12.5 and about e15.5, we first

assessed the number of corticotrophs in the anterior lobe of e13.5 pituitaries from wild-type and NeuroD1 mutant mice. Using ACTH immunohistochemistry to assess POMC expression and terminal differentiation of corticotrophs, a clear reduction in number of ACTH(POMC)-positive cells was observed in mice heterozygous (+/-) for the NeuroD1 null allele (Fig. 3.2B compared to Fig. 3.2A) and this reduction was even greater in NeuroD1^{-/-} mice (Fig. 3.2C). Not only was the number of positive cells decreased but also ACTH immunoreactivity was lower in the remaining cells. The distribution of POMC cells is also affected by NeuroD1 dosage. In wild-type pituitaries, corticotrophs are present throughout the anterior lobe (Fig. 3.2A) while in heterozygous and null mice, the remaining POMC-positive cells were mostly in the ventral part of the gland (Fig. 3.2B, C), as observed in normal early development (14). Thus, NeuroD1 is required for the appropriate timing of corticotroph differentiation.

While the reduced POMC expression indicates a delay in corticotroph differentiation, it may not reflect the loss of corticotroph cells. In order to assess this possibility, we investigated expression of another corticotroph-specific marker, Tpit. Strikingly, the expression of Tpit in heterozygous (Fig. 3.2E) and null (Fig. 3.2F) pituitaries is similar to its expression in wild-type pituitary (Fig. 3.2D). Expression of another hormone marker α GSU (Fig. 3.2G, H, I) and of the pan-pituitary transcription factor Pitx1 (Fig. 3.2J, K, L) were not affected by NeuroD1 dosage. These results indicate that corticotroph commitment is not affected in absence of NeuroD1, but that only the last step in corticotroph

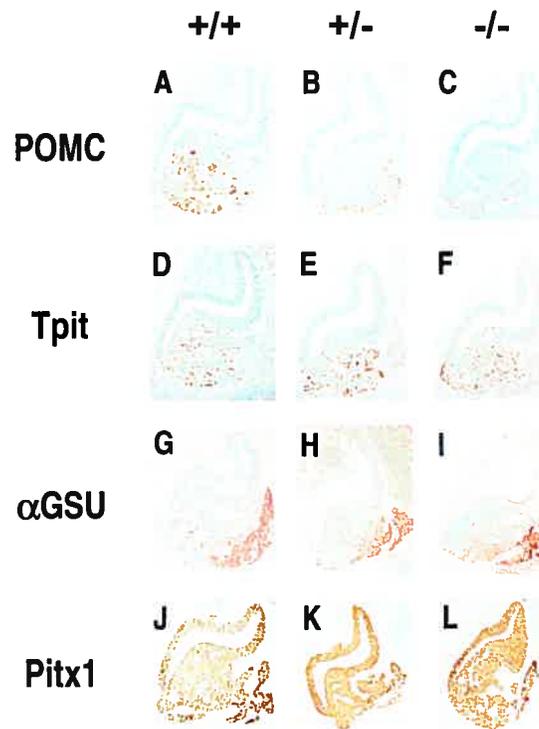


Figure 3.2. Delayed corticotroph differentiation in e13.5 NeuroD1(BETA2)-null mice. In wild-type mice (+/+), POMC (A) and Tpit (D) expression patterns as assessed by immunohistochemistry are similar and α GSU (G) is mostly restricted to the rostral tip of the pituitary. In NeuroD1 heterozygous mice (+/-), the number of corticotrophs was markedly decreased (B), but Tpit (E), α GSU (H) and Pitx1 (K) expression patterns are similar to those of wild-type animals. The remaining cells are located ventrally. In null mice (-/-), only a few corticotroph cells are detected in the ventral region of the pituitary (C). In contrast, Tpit (F), α GSU (I) and Pitx1 (L) expression patterns are unchanged. Sections (A) to (L) are sagittal with the embryo facing to the right.

differentiation (as revealed by POMC expression) is delayed, but not completely abolished in NeuroD1 $-/-$ mice.

Corticotrophs are the first anterior pituitary hormone-producing cells to fully differentiate. The role of corticotrophs on differentiation of other pituitary lineages is not known, although their number is not required to maintain the distribution of other cell types (28). In order to assess whether the delay in terminal corticotroph differentiation may affect other lineages, we investigated expression of other hormones that appear later. At e14.5, the delay of corticotrophs terminal differentiation is still observed in NeuroD1-deficient mice (Fig. 3.3B, C) relative to normal pituitaries (Fig. 3.3A) although Tpit expression is similar in all pituitaries (Fig. 3.3D, E, F). This delay in corticotroph differentiation does not seem to affect expression of other pituitary markers. α GSU expression is restricted in the rostral and ventral parts of pituitaries of the three genotypes (Fig. 3.3G, H, I). Pit1-independent expression of β TSH in the rostral tip is also unaffected as is the appearance of Pit1-dependent β TSH cells in the most ventral part of the anterior lobes (Fig. 3.3 J, K, L). Finally, expression of Pitx1 is not affected by the delay of corticotroph differentiation (Fig 3.3 M,N,O). The NeuroD1 differentiation delay is thus specific to corticotroph cells.

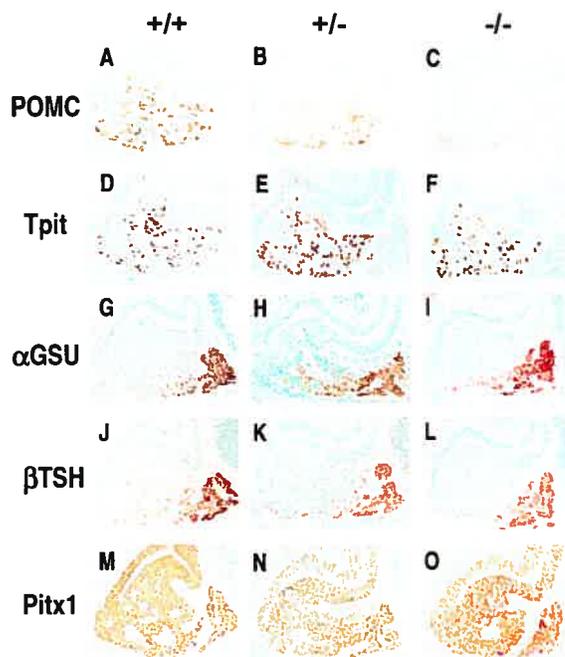


Figure 3.3. Corticotroph deficiency is restricted to this lineage. As in e13.5 pituitaries (Fig. 2), the distribution and number of POMC cells relative to those of wild-type animals (A) is affected by NeuroD1 dosage at e14.5. The lower the dosage, the less there are corticotrophs and the more ventrally they are located (B to C). Tpit expression is unaffected (D, E, F). Expression of other pituitary markers α GSU (G,H,I), β TSH (J, K,L) and Pitx1 (M, N,O) is unchanged by lower dosage of NeuroD1. Sections (A) to (O) are sagittal with the embryo facing to the right.

3.3.3 The NeuroD1-dependent differentiation delay is transient

The expression of NeuroD1 is transient during pituitary development. At e15.5, NeuroD1 protein is not detected anymore (13). We therefore analyzed e16.5 pituitaries in order to evaluate the putative consequences of NeuroD1 deficiency beyond the time of detectable NeuroD1 expression. At that age, POMC-positive cells were in normal number and distribution (Fig. 3.4A, B, C), and the distribution of those cells is similar to that of Tpit positive cells (Fig. 3.4D, E, F). It therefore appears that the delay in corticotroph differentiation has fully recovered by e16.5. The delay of corticotroph differentiation had no secondary effect on the expression of other pituitary markers. α GSU, β TSH and GH were normally expressed in the anterior lobe (Fig. 3.4G-O). Similarly, transcription factors Pitx1, Pit1 (a factor restricted to GH, PRL and β TSH cells), and SF1 (a gonadotroph-restricted factor) were expressed normally in NeuroD1 +/- and -/- pituitaries (Fig. 3.4P-X). The dosage effect of NeuroD1 on corticotroph differentiation (as revealed by POMC expression) is therefore restricted to the time period when NeuroD1 is detectable in the developing corticotrophs, and this delay appears to be fully recovered beyond that point.

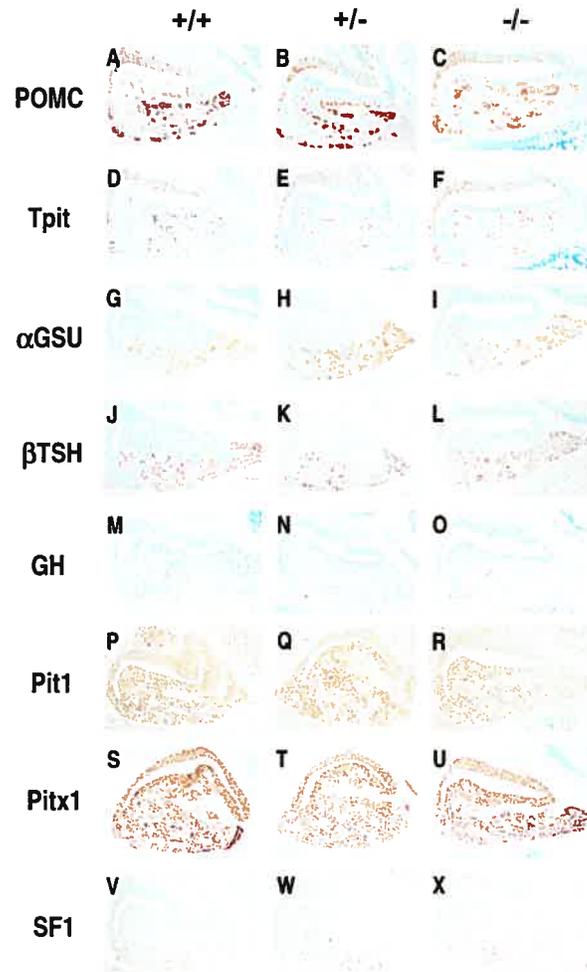


Figure 3.4. Recovery of corticotroph differentiation at e16.5 in NeuroD1(BETA2)-deficient mice. In contrast to early stages of pituitary development, the distribution of POMC cells was similar in wild-type (A), heterozygous (B) and NeuroD1-null mice (C). Tpit expression patterns were also similar (D, E, F), as were those of α GSU (G, H, I), β TSH (J, K, L), GH (M, N, O), which starts to be detectable at e16.5 and those of transcription factors Pit1 (P, Q, R) and Pitx1 (S, T, U) and SF1 (V, W, X). Sections (A) to (X) are sagittal with the embryo facing to the right.

3.3.4 Neurogenins 1, 2 and 3 are not required for POMC expression

In other systems that require NeuroD1 for their development, NeuroD1 expression depends on prior action of transcription factors of the neurogenin (Ngn) family. For example, Ngn1 and/or Ngn2 expression precedes that of NeuroD1 in the nervous system (21;29;30) and Ngn3 precedes NeuroD1 in the hypothalamus and pancreas (31;32). We therefore tested the possibility that such a cascade of neurogenic bHLH transcription factors could also exist in the pituitary for corticotroph differentiation.

To address this question, we first investigated Ngn factors expression in the developing pituitary. Immunohistochemical analysis of mouse pituitaries from e10.5 to e15.5 using anti-Ngn1 and anti-Ngn3 antibodies did not reveal any expression of Ngn1 or Ngn3 (data not shown). However, we detected Ngn2 expression in a small number of nuclei of the anterior part of the pituitary at e12.5 and e13.5 (Fig. 3.5A and E). While the Ngn2 antibody revealed Ngn2 protein in tissues known to express this gene by *in situ* hybridization (33;34) such as in dorsal root ganglia (Fig. 3.5B) or in cerebral cortex (Fig. 3.5C) but not in ventral thalamus for example (Fig. 3.5D), it also suggested the presence of non-nuclear Ngn2 in the periphery of the developing pituitary (Fig. 3.5A). This labeling is likely artifactual as only the nuclear staining was lost in Ngn2^{-/-} pituitaries (Fig. 3.5F).

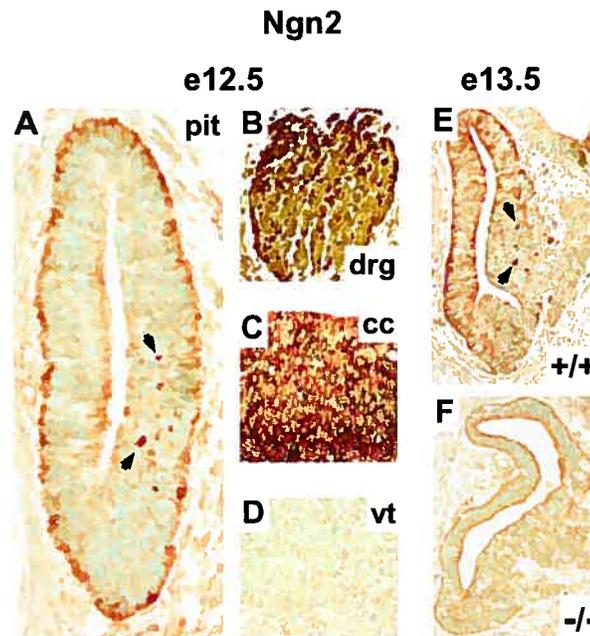


Figure 3.5. Neurogenin 2 is expressed during early pituitary development. Ngn2 was detected by immunohistochemistry in a few nuclei (arrowheads) of the pituitary at e12.5 (A) and e13.5 (E). As expected, from published *in situ* hybridization data (33;34), Ngn2 was detected in B) dorsal root ganglia (drg), C) cerebral cortex (cc) but not in D) ventral thalamus. Only the nuclear signal (arrowheads in A and E) is lost in e13.5 Ngn2^{-/-} pituitary (F); other immunoreactivity is still present in mutant tissues and therefore is artifactual. Sections are sagittal with the embryo facing to the right and ventral at bottom

Since *Ngn2* appears to be transiently expressed in the developing pituitary, we investigated its role during pituitary development. Mouse mutants for *Ngn1* and *Ngn2* genes were investigated for putative delays in corticotroph differentiation as shown in *NeuroD1*^{-/-} mice. The absence of these *Ngn* genes did not affect the timing of corticotroph differentiation at e13.5 as assessed by staining for POMC (Fig. 3.6A, B) or for *Tpit* (Fig. 3.6C, D), and it did not alter expression of *NeuroD1* (Fig. 3.6E, F). Similar results were obtained in mice mutant for either *Ngn1* or *Ngn2* (data not shown). The *Ngn1* and *2* genes are therefore not upstream regulators of *NeuroD1* as they are in neural tissues.

The *Ngn* genes could have played a role, directly or indirectly, in maintenance of POMC expression beyond the window of *NeuroD1* expression and to exclude this possibility, we also assessed POMC expression and corticotroph differentiation at e15.5. Both POMC (Fig. 3.6G, H) and *Tpit* (Fig. 3.6I, J) expression were not affected in *Ngn* mutant mice. The *Ngn1* and *2* genes are therefore not required for definitive corticotroph differentiation. Further work will be required to determine whether other cell-restricted bHLH factors are essential either before or after *NeuroD1* for corticotroph differentiation and for POMC transcription.

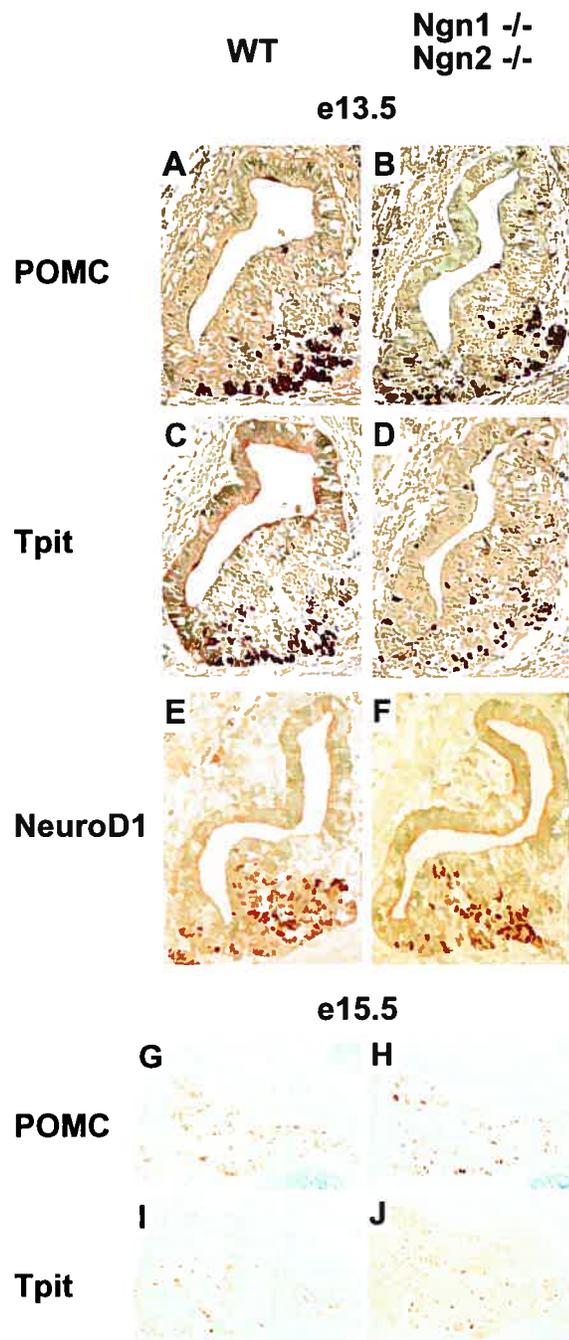


Figure 3.6. Neurogenin 1 and Neurogenin 2 genes are not required for differentiation of pituitary corticotrophs. POMC (A, B, G, H), Tpit (C, D, I, J) and NeuroD1 (E, F) expression patterns are similar in wild-type (A, C, E, G, I) and animal mutants for Ngn1 and Ngn2 (B, D, F, H, J) at e13.5 (A-F) and e15.5 (G-J). Sections are sagittal with the embryo facing to the right.

3.4 Discussion

Previous work identified two cell-specific regulators of POMC transcription, *Tpit* and *NeuroD1*, that constitute early markers of corticotroph differentiation. They are expressed in the corticotroph progenitors, or pre-corticotrophs, of the ventral part of the anterior lobe just before POMC at e12.5 (Fig. 3.7A). Pre-corticotrophs express very little, if any, POMC and they clearly form in absence of *NeuroD1* (Fig. 3.7B and Fig. 2 and 3) or of *Tpit* [Fig. 3.7C and (15)]. The present work has defined fetal corticotrophs (e12.5-e15.5) and shown their dependence on *NeuroD1*. After e15.5 and cessation of *NeuroD1* protein expression, definitive or adult corticotrophs are no longer dependent on *NeuroD1*. Future work will determine whether and which factor(s) take over the role of *NeuroD1* in adult corticotrophs.

The overall effect of *NeuroD1* deficiency in the pituitary is a delay in the appearance of corticotrophs that is recovered by day e16.5. Therefore, only *NeuroD1*-expressing fetal corticotrophs are dependent on this factor for POMC expression and differentiation (Fig. 3.7B). Others have suggested that *NeuroD1(BETA2)* has no effect on corticotroph differentiation (26), but these authors missed the importance of *NeuroD1* because they did not investigate its role in early development.

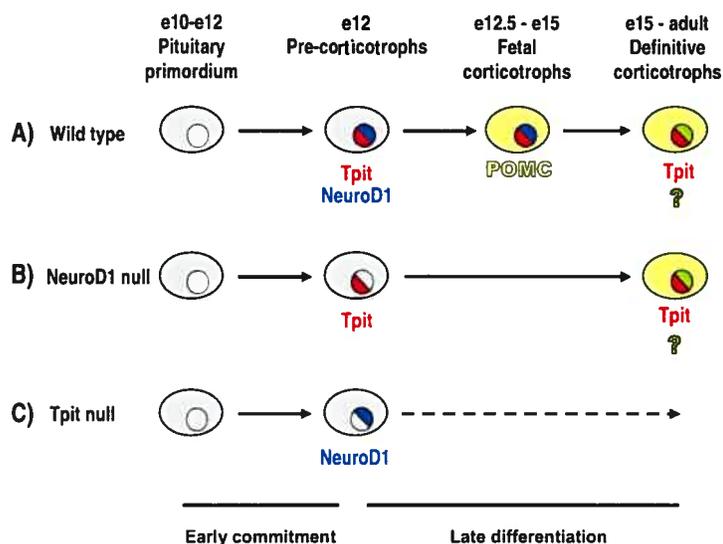


Figure 3.7. NeuroD1 and Tpit are both required for corticotroph differentiation, but not for commitment. **A)** Tpit and NeuroD1 expression in pre-corticotrophs starts at around e12 and they are the first markers of corticotrophs. Terminal corticotroph differentiation occurs at e12.5 when POMC is detected. NeuroD1 is expressed until e15 and it is a marker of early fetal corticotrophs. Another factor may replace it in definitive corticotrophs. **B)** In NeuroD1-null animals, expression of Tpit in pre-corticotrophs indicates that commitment has occurred but early corticotrophs do not fully differentiate to express POMC. However, definitive corticotrophs do not express NeuroD1 and do not require it to reach terminal differentiation. **C)** Mutagenesis of Tpit does not prevent NeuroD1 expression and pre-corticotroph commitment but Tpit is essential for maintenance/proliferation of adult corticotroph (15).

The commitment of pituitary corticotrophs does not require NeuroD1 (Fig. 3.2, 3.3, and 3.7B), nor does it require Tpit [Fig. 3.7C, (15)]. However, maintenance and/or expansion of adult corticotroph does require Tpit (15) but not NeuroD1. Does NeuroD1 only play a transient role for early onset of POMC expression or is it replaced by another factor around e15 ? Other tissues that require neurogenic bHLH factors for their development or differentiation sequentially express different members of this transcription factor family (21). Our data indicate that the Ngn1, Ngn2 and Ngn3 genes are not essential for pituitary corticotroph differentiation (Fig. 3.6) despite limited expression of Ngn2 in the developing pituitary (Fig. 3.5). The control of corticotroph NeuroD1 expression thus appears to be different from the pancreas and brain where Ngn genes precede and control NeuroD1 expression (21;31;32). It is possible that other neurogenic bHLH or other types of transcription factors take over after e15 the early role played by NeuroD1: indeed, it is at about e15 that the developing pituitary starts to receive portal blood and signals from the hypothalamus (35;36). Other classes of transcription factors may thus be induced in response to signals and responsible for maintenance of POMC transcription.

The requirement for NeuroD1 during early differentiation is not absolute and we could detect a few POMC-expressing cells in the ventral part of the anterior lobe in NeuroD1^{-/-} pituitaries (Fig. 3.2 and 3.3). This indicates that ventral and dorsal pre-corticotrophs of the anterior pituitary are different, possibly because of ventral signals that are stimulatory for corticotroph differentiation or

because of dorsal signals that may be inhibitory. Various signals such as BMPs and FGF8 have been proposed to influence corticotroph differentiation but divergent conclusions have resulted on their putative involvement depending on experimental paradigm (10;11). Irrespective of those possibilities, it appears that NeuroD1 may set the sensitivity of pre-corticotrophs to these signals.

The present work clearly indicates that NeuroD1 does not contribute to control of Tpit expression (Fig. 3.2 and 3.3), and conversely, the opposite was also shown for NeuroD1 expression in Tpit $-/-$ mice (15). Thus, Tpit and NeuroD1 appear to be regulated completely independently of each other, both being required as positive regulators of POMC transcription and corticotroph differentiation. Interestingly, commitment of pre-corticotrophs is not controlled by either of these factors individually and future work will determine whether they may do so jointly. The independent action of Tpit and NeuroD1 on corticotrophs is suggestive of separate extracellular signals for control of NeuroD1 and Tpit expression. We currently do not know what these signals may be but their identification will be essential to understand early events of cell fate decisions during pituitary differentiation.

How do the developmental roles of NeuroD1 and Tpit relate to their transcriptional activity on the POMC promoter? We have shown that these two factors can functionally interact on the POMC promoter for transcriptional activation. The synergistic activation by bHLH factors and Tpit indicated that

these two factors are not redundant for POMC transcription as they are not redundant for differentiation. Although bHLH factors and Tpit can interact physically, the presence of Pitx1 is required for their synergistic activation of the POMC promoter. This is similar to the β LH promoter where Egr and SF1 interact with Pitx1 for transcriptional activation (37;38). Since Tpit and bHLH factors interact individually with Pitx1, it suggests that tissue-specific regulation of POMC transcription depends on a complex containing Pitx1, Tpit and NeuroD1/Pan1. This complex may be the point of convergence of different early differentiation signals and/or pathways acting through Tpit and NeuroD1 for transcriptional activation of POMC and onset of corticotroph differentiation at e12.5. Analysis of the control of Tpit and NeuroD1 expression should lead to identification of earlier upstream regulators of corticotroph differentiation.

3.5 Materials and methods

3.5.1 Mice antibodies and immunohistochemistry

Knockout mice for NeuroD1(BETA2) and for Ngn1 and 2 were described in (27;30), respectively. Production of NeuroD1 (13), Tpit (14) and Pitx1 (39) antibodies was described elsewhere. The Ngn1 and Ngn2 antibodies were obtained from Chemicon (Temecula, CA). The Ngn3 antibody provided by Dr M.

German was described (40). Pituitary hormone antibodies were obtained through the NIH National Hormone and Pituitary Program, except for the ACTH antibody (Cortex Biochem, San Leandro, CA). Immunohistochemistry was performed as described (14).

3.5.2 Plasmids and transfection assays

Plasmids were described previously (12;14). CV1 and GH3 cells were grown and transfected as described (14).

3.5.3 Pulldown assay

MBP-LacZ, MBP-Tpit and MBP-Tpit deletion mutant were purified from *E. coli* BL21 following the manufacturer's recommendations (New England Biolabs, Beverly, MA) and 500 ng of each fusion protein coupled to amylose beads was used in all assays. Pan1 and NeuroD1 were synthesized *in vitro* using [³⁵S]methionine and the TnT-coupled transcription-translation rabbit reticulocyte lysate system (Promega). Pull-downs were performed as described (41).

3.6 Acknowledgements

We are thankful to Dr A.F. Parlow of the NIH Pituitary Hormone Program for providing antibodies against various pituitary hormones. We thank Dr David Anderson, Caltech, for Ngn1 mutant mice and Dr Michael S. German, UCSF, for the anti-Ngn3 antibody. We also thank Dr. Ken Morohashi (Okazaki, Japan) for the SF1 antibody and Dr. Carol Schuurmans (U. Calgary, Alberta) for help with Ngn1^{-/-}, Ngn2^{-/-} embryos. We are indebted to Annie Vallée for preparation of tissue sections and to Lise Laroche for her expert secretarial assistance. B.L. was supported by a fellowship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). M.J.T. is supported by NIH grants from HD and DK. This work was supported by the National Cancer Institute of Canada with funds provided by the Canadian Cancer Society.

3.7 References

1. Japon MA, Rubinstein M, Low MJ 1994 In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125
2. Lanctôt C, Lamolet B, Drouin J 1997 The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124:2807-2817

3. Gage PJ, Camper SA 1997 Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet* 6:457-464
4. Gage PJ, Suh HY, Camper SA 1999 Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126:4643-4651
5. Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu R, Izpisua Belmonte JC, Rosenfeld MG 1999 Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401:279-282
6. Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF 1999 Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 401:276-278
7. Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H 1997 Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278:1809-1812
8. Tremblay JJ, Lanctôt C, Drouin J 1998 The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim3/Lhx3*. *Mol Endocrinol* 12:428-441
9. Suh H, Gage PJ, Drouin J, Camper SA 2002 *Pitx2* is required at multiple stages of pituitary organogenesis : pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129:329-337
10. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T 1998 Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the

emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125:1005-1015

11. Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG 1998 Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12:1691-1704
12. Poulin G, Turgeon B, Drouin J 1997 NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
13. Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, Drouin J 2000 Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* 20:4826-4837
14. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J 2001 A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859
15. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Tsai JPY, Couture C, Gauthier Y, Drouin J 2003 Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* 17:738-747
16. Naya FJ, Stellrecht CMM, Tsai MJ 1995 Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9:1009-1019
17. Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB 1997 The basic helix-loop-helix transcription factor beta2/neurod is expressed in

- mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression.
Proc Natl Acad Sci USA 94:3560-3564
18. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H
1995 Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic
helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-844
 19. Olson EN, Klein WH 1994 bHLH factors in muscle development: dead
lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev*
8:1-8
 20. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH 1995 Absence of blood formation in
mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373:432-
434
 21. Lee JE 1997 Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr*
Neurobiol 7:13-20
 22. Papaioannou VE 2001 T-box genes in development: from hydra to humans.
Int Rev Cytol 207:1-70
 23. Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A,
Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL 2001 *Tbr1* regulates
differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29:353-366
 24. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH 2000
A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*
100:655-669
 25. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M,
Malpuech G, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ,

- Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, Drouin J 2003 Human and mouse Tpit gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 17:711-716
26. Liu J, Lin C, Gleiberman A, Ohgi KA, Herman T, Huang HP, Tsai MJ, Rosenfeld MG 2001 Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8674-8679
27. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ 1997 Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11:2323-2334
28. Allen RG, Carey C, Parker JD, Mortrud MT, Mellon SH, Low MJ 1995 Targeted ablation of pituitary pre-proopiomelanocortin cells by herpes simplex virus-1 thymidine kinase differentially regulates mRNAs encoding the adrenocorticotropin receptor and aldosterone synthase in the mouse adrenal gland. *Mol Endocrinol* 9:1005-1016
29. Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson D 1999 Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* 13:1717-1728
30. Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ, Guillemot F 2000 A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14:67-80

31. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F 2000 neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1607-1611
32. Huang HP, Liu M, El Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ 2000 Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20:3292-3307
33. Sommer L, Ma Q, Anderson DJ 1996 neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8:221-241
34. Gradwohl G, Fode C, Guillemot F 1996 Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev Biol* 180:227-241
35. Lugo DI, Pintar JE 1996 Ontogeny of basal and regulated secretion from POMC cells of the developing anterior lobe of the rat pituitary gland. *Dev Biol* 173:95-109
36. Lugo DI, Pintar JE 1996 Ontogeny of basal and regulated proopiomelanocortin-derived peptide secretion from fetal and neonatal pituitary intermediate lobe cells: melanotrophs exhibit transient glucocorticoid responses during development. *Dev Biol* 173:110-118
37. Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, Drouin J 1999 Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* 18:3431-3441

38. Tremblay JJ, Drouin J 1999 Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone b gene transcription. *Mol Cell Biol* 19:2567-2576
39. Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J 1999 Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140:1416-1422
40. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS 2000 Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127:3533-3542
41. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M 1997 The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 16:5687-5696

Chapitre 4
DISCUSSION

DISCUSSION

Ce travail a permis d'identifier un nouveau facteur de transcription, *Tpit*, de montrer son importance et de mieux caractériser celle de *NeuroD1* dans la transcription de la POMC et la différenciation des cellules corticotropes et mélanotropes. En ajout aux travaux sur *Tpit* rapportés ici, d'autres auteurs de notre laboratoire (Pulichino et al., 2003b; Pulichino et al., 2003a) et d'ailleurs ont confirmé les thèses principales de Lamolet et al. (2001), comme l'interaction *Pitx1* – *Tpit*, et ont contribué à améliorer la caractérisation de *Tpit*. L'importance de *Tpit* dans la différenciation des cellules POMC de l'hypophyse a été pleinement confirmée par l'inactivation du gène chez la souris (Pulichino et al., 2003a). Dans les souris *Tpit*^{-/-}, seules quelques très rares cellules expriment la POMC dans l'hypophyse en développement et adulte et on détecte de très bas niveaux sanguins d'ACTH comme chez les patients porteurs de mutations qui inactivent *TPIT*. Toutefois, l'expression de *NeuroD1* est détectée. Il apparaît donc des cellules pré-corticotropes et c'est l'étape de différenciation finale caractérisée par l'expression de la POMC qui n'a pas eu lieu, bien que la détermination des corticotropes ne soit pas affectée. Ces travaux confirment donc la conclusion de Lamolet et al (2001) que *Tpit* fait partie de la cascade moléculaire d'événements menant à la différenciation des cellules POMC. D'autre part, on peut aussi constater que *Tpit* s'insère très bien dans le modèle de développement hypophysaire que j'ai proposé (Figure 4.1). L'analyse de ce modèle permet de proposer l'existence d'un code

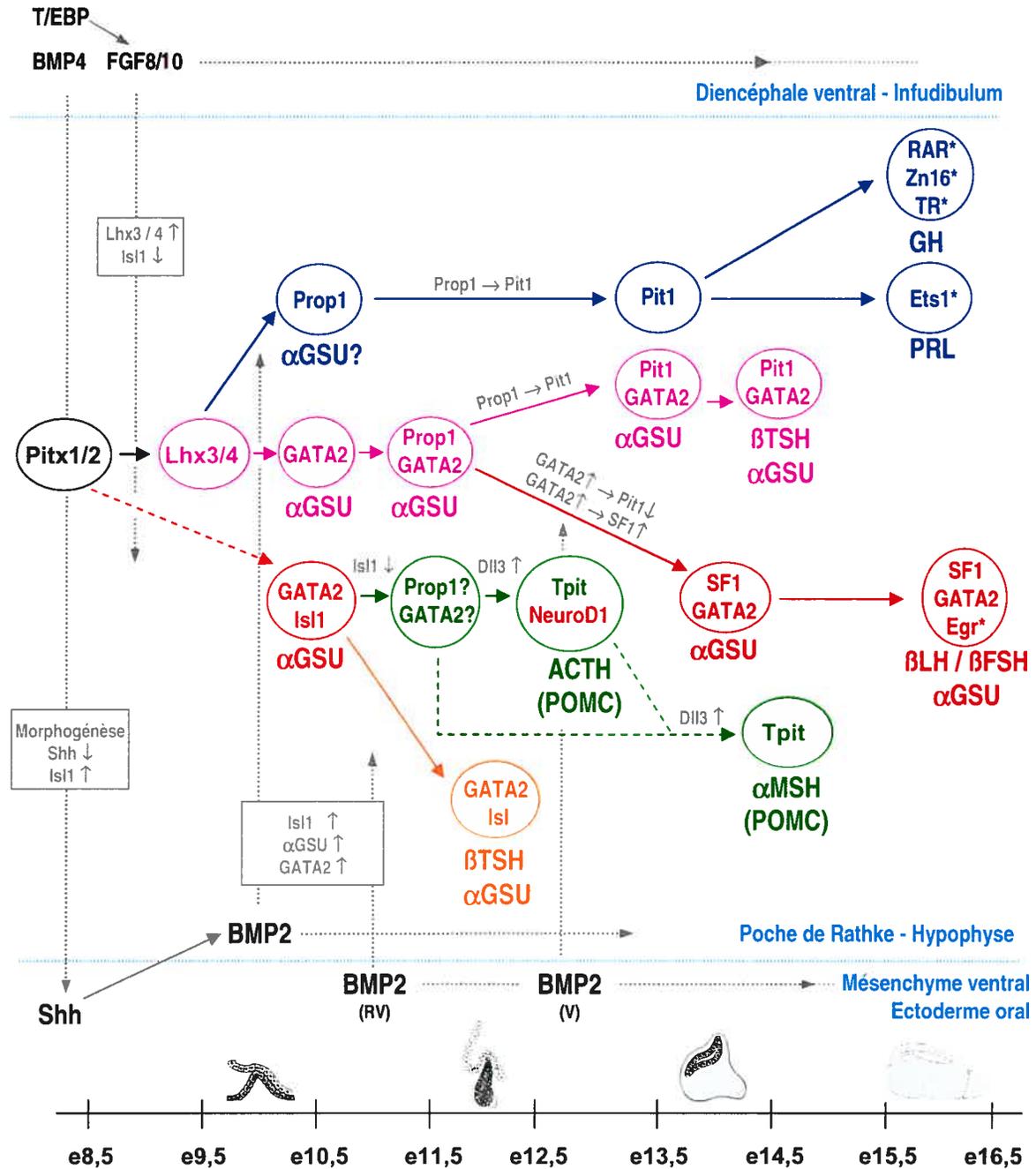


Figure 4.1 : Différenciation des lignées hormonales hypophysaires. La différenciation des lignées est indiquée dans le temps et dans l'axe dorso-ventral. Les flèches grises horizontales indiquent la durée de l'expression des facteurs de croissance dans le temps. La hauteur des flèches grises verticales indique la région et les lignées influencées par le facteur de croissance. L'effet est mentionné dans une boîte grise. * indique que le facteur de transcription contribue à l'histo-spécificité chez l'adulte, mais le moment de l'initiation de l'expression n'est pas connu. Noter le passage de la source de BMP2 d'une position rostro-ventrale (RV) à ventrale (V).

combinatoire de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des lignées hypophysaires (Tableau IV-1). Ce code s'établirait en quatre étapes. La première étape est le stade stomodeal caractérisé par l'expression de Pitx1/2 dans l'ectoderme oral duquel l'hypophyse est dérivée, puis l'expression de Lhx3 caractérise le stade de la Poche de Rathke vers e9,5. À e12,0, l'hypophyse est régionalisée à l'échelle moléculaire selon des gradients opposés dans l'axe dorso-ventral de Prop-1 et GATA2, pour les cellules dépendantes de Lhx3, et selon l'expression de Tpit qui marque l'origine des cellules POMC. La dernière étape est celle de la différenciation. Les premières à se différencier sont les corticotropes. Leur différenciation est concomitante à la compartimentation par Tpit vers e12,5 et elles expriment aussi NeuroD1. Celle des autres lignées suit avec l'expression d'autres marqueurs spécifiques comme Pit1 et SF1. Et chaque lignée peut être caractérisée par une combinaison de facteurs de transcription exprimés.

4.1 Relations développementales entre les corticotropes et les gonadotropes

Lorsque l'inactivation génique de Tpit a été réalisée, un effet inattendu a été observé dans l'hypophyse. À la place des cellules POMC, Pulichino et al (2003b) ont détecté des cellules exprimant des gonadotropines (LH et FSH) et quelques cellules TSH indépendantes de Pit1. L'effet est particulièrement frappant dans le lobe intermédiaire. Une première interprétation de cette observation serait que les cellules POMC et les gonadotropes soient très proches l'une de l'autre dans

Tableau IV-1 : Code combinatoire transcriptionnel de différenciation des lignées hypophysaires

e8,5	e9,5	e12,0	e12,0 - e15,0	Lignées différenciées
Pitx1/2	Lhx3	Prop-1	Pit-1	Lactotrope Somatotrope
		Prop-1/GATA2	Pit-1	Thyrotrope
		GATA2	SF1	Gonadotrope
	Indépendance de Lhx3	GATA2		Thyrotrope indép. de Pit1
		Tpit	NeuroD1	Corticotrope
				Mélanotrope

À l'étape stomodéale (e8,5), seuls Pitx1 et 2 sont exprimés. L'activation de Lhx3 caractérise le stade de la poche de Rathke à partir de e9,5. L'hypophyse est compartimentalisée à e12 en fonction de l'expression de Prop-1, GATA2 et Tpit, et c'est aussi à ce moment que se déclenchent les étapes de différenciation finale qui impliquent des facteurs comme Tpit, NeuroD1, Pit1 et SF1.

l'arbre de différenciation des lignées hypophysaires et que les cellules qui auraient dû devenir corticotropes dans une hypophyse sauvage sont devenues gonadotropes dans les hypophyses *Tpit*^{-/-}. J'appelle ces cellules « néo-gonadotropes ». Et de fait, un antagonisme transcriptionnel entre *Tpit* et SF1, un marqueur des gonadotropes requis pour la synthèse hormonale, a aussi été observé au laboratoire. Ceci a suggéré un modèle de différenciation sur un mode binaire selon lequel des cellules bipotentes POMC/gonadotropes exprimant à la fois *Tpit* et SF1 prendraient une voie de différenciation plutôt que l'autre selon le résultat de l'antagonisme entre ces deux facteurs. L'expression des marqueurs spécifiques à la lignée « perdante » cesserait alors (Pulichino et al., 2004).

Mon interprétation des résultats est différente pour les raisons suivantes. 1) Le modèle binaire requiert la co-expression de *Tpit* et SF1 dans l'hypophyse. Toutefois, si on peut détecter la protéine *Tpit* vers e12,0-e12,5, l'ARNm de SF1 commence à être détectable plus tard à e13,5 (Ingraham et al., 1994). Or, à ce stade, la différenciation des corticotropes, indiquée par l'expression de la POMC, est déjà bien entreprise. 2) Si l'antagonisme entre SF1 et *Tpit* est essentiel pour déterminer quelle voie les pré-POMC/gonadotropes vont prendre, on s'attendrait à observer la situation développementale réciproque à celle de l'inactivation génique de *Tpit* dans le cas de celle de *SF1*, soit une augmentation marquée du nombre de corticotropes aux dépens des gonadotropes. Or, dans les hypophyses *SF1*^{-/-}, le nombre de cellules POMC est similaire à celui des hypophyses normales (Zhao et al., 2001). 3) La protéine NeuroD1 est détectée à un niveau élevé d'expression

uniquement dans les corticotropes depuis le début de la différenciation terminale à e12,0. Cette induction ne dépend pas de *Tpit* (Pulichino et al., 2003b). Cela veut dire qu'il existe une voie d'induction corticotrope indépendante d'un modèle binaire et mise en place avant e12,0, soit deux jours avant que l'ARNm de SF1 soit détectable. 4) Dans le modèle binaire, en accord avec ce qu'on observe dans les hypophyses sauvages, les gonadotropes différenciées n'expriment ni *Tpit*, ni *NeuroD1*. Cependant, dans les cellules néo-gonadotropes des hypophyses *Tpit*^{-/-}, il y a expression de *NeuroD1* à des niveaux élevés dans le lobe antérieur et expression de la β -galactosidase indiquant que le promoteur de *Tpit* est actif dans les néo-gonadotropes alors qu'il est habituellement éteint dans les gonadotropes. Ceci suggère que les néo-gonadotropes n'ont pas pris la voie gonadotrope par défaut en absence de *Tpit* face à SF1. Les néo-gonadotropes seraient plutôt passés par la voie corticotrope, dont ils gardent des caractéristiques pré-corticotropes, comme l'expression forte de *NeuroD1* et un promoteur *Tpit* actif, avant d'être détournées vers la voie gonadotrope.

Pour ces raisons, je ne crois pas que le modèle binaire ait un rôle essentiel à jouer au cours du développement hypophysaire. Par contre, il pourrait se révéler important pour diriger la différenciation d'éventuelles cellules souches dans l'hypophyse adulte et/ou maintenir la distribution des différentes lignées. Les résultats de l'inactivation génique de *Tpit* montrent quand même qu'il y a un lien entre les corticotropes et les gonadotropes. Mais je suggère que ce lien soit d'origine « géographique » dans l'hypophyse, ces deux lignées étant les plus

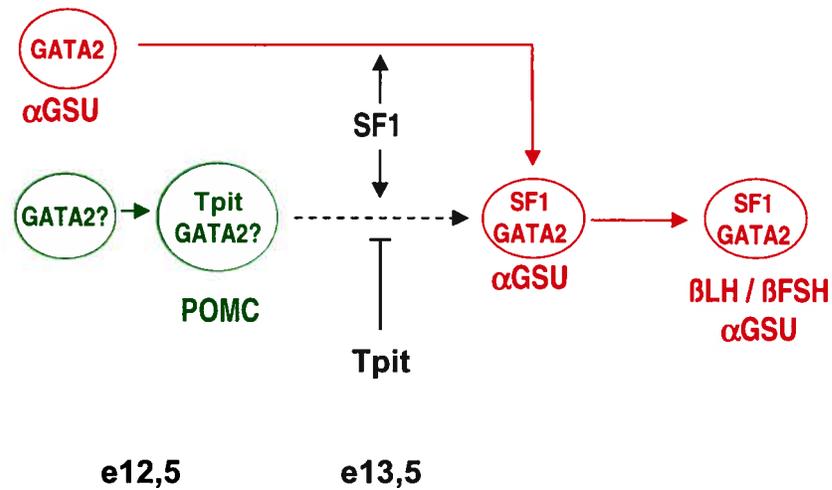


Figure 4.2 : Importance de Tpit dans le maintien des lignées POMC. Après qu'elles ont commencé à apparaître à e12,5, les cellules POMC sont soumises à l'action du facteur pro-gonadotrope SF1 qui est induit ventralement dans le lobe antérieur à e13,5. Tpit antagonise l'action de SF1 dans ces cellules et les maintient dans leur voie de différenciation.

ventrales. Le modèle que je propose est présenté à la figure 4.2. Les corticotropes commencent à se différencier à e12.5 indépendamment des gonadotropes et de l'expression de SF1. Puis, à e13,5, lorsqu'il y a induction de SF1 dans la région ventrale de l'hypophyse, possiblement par GATA2 induit lui-même par BMP2 exprimé dans le mésenchyme sous l'hypophyse (Dasen et al, 1999), l'antagonisme Tpit / SF1 sert à maintenir les corticotropes dans leur voie. En absence de Tpit, SF1 peut agir dans des corticotropes et causer leur récupération vers un destin gonadotropique alors qu'elles étaient déjà suffisamment engagées dans la voie corticotrope pour continuer à exprimer le marqueur NeuroD1 et LacZ sous contrôle du promoteur Tpit dans le cas de l'inactivation génique qui a été réalisée par Pulichino et al (2003b). Dans le cas de l'inactivation génique de SF1, on ne s'attend pas à ce qu'il y ait une augmentation du nombre de corticotropes. Et c'est ce qui a été observé (Zhao et al., 2001). L'idée qu'il existe une forme de « résistance » corticotrope peut aussi être inférée de l'observation que, bien que les facteurs de croissance BMP2/4 ont des effets négatifs sur l'apparition des cellules POMC au début du développement hypophysaire (Ericson et al., 1998) et sur la transcription du gène (*Nudi*, mémoire de maîtrise), la différenciation corticotrope progresse très bien à partir de e12,5 alors que BMP2 est exprimé juste sous l'hypophyse.

Une façon de réfuter le modèle présenté à la figure 4.2 en supportant plutôt celui de la différenciation binaire, serait de montrer l'expression de SF1 à e12,5 dans les hypophyses *Tpit*^{-/-} alors qu'elle commence à e13,5 dans les hypophyses

sauvages. C'est-à-dire de montrer l'engagement néo-gonadotrope dès que *Tpit* fait défaut au lieu d'attendre que SF1 induit à e13,5 détourne des pré-corticotropes bloquées vers la voie gonadotrope.

Par ailleurs, si la trans-différenciation des mélanotropes est évidente dans le lobe intermédiaire, elle ne m'apparaît pas l'être autant dans le lobe antérieur pour les cellules corticotropes. Premièrement, il y a clairement trans-différenciation dans la région caudale de l'hypophyse à e16,5. Mais, cette région est celle où se rejoignent les lobes antérieur et intermédiaire et il est donc difficile de déterminer si ces néo-gonadotropes ont été détournées d'un destin corticotrope ou si elles sont en fait les premières qui auraient dû être des mélanotropes en présence de *Tpit*. Deuxièmement, si on regarde dans tout le lobe antérieur, à l'exception de la région caudale où la situation est ambiguë, le nombre de cellules SF1+ dans les hypophyses *Tpit* *-/-* à e16,5 semble être similaire à celui des hypophyses normales. Or, la présence des néo-gonadotropes devrait faire doubler ce nombre puisque gonadotropes et corticotropes sont en proportion équivalente dans l'hypophyse. La question « Y a-t-il des néo-gonadotropes dans le lobe antérieur des souris *Tpit* *-/-* ? » ne présente donc pas de réponse claire. Et elle est d'autant plus pertinente qu'il existe aussi un antagoniste transcriptionnel entre NeuroD1 et SF1 similaire à celui qui existe entre *Tpit* et SF1 (Pulichino, résultats non publiés). Il se pourrait donc que, dans les lobes antérieurs des hypophyses *Tpit* *-/-*, on ne retrouve pas de néo-gonadotropes mais plutôt des pré-corticotropes bloquées à ce stade exprimant NeuroD1 mais pas SF1. Pour répondre à cette question et lever

l'ambiguïté, on pourrait déterminer si les cellules NeuroD1+ ou β -galactosidase + (i.e. qui ont un promoteur *Tpit* actif), expriment bel et bien SF1, LH ou FSH en colocalisation.

L'existence d'un antagonisme entre NeuroD1 et SF1 pourrait aussi contribuer au maintien de la voie de différenciation corticotrope dans les cellules qui expriment NeuroD1. Cependant, l'inactivation génique de NeuroD1 ne semble pas non plus augmenter le nombre de gonadotropes à e16,5 (Lamolet et al., 2004). Par conséquent, *Tpit* et NeuroD1 semblent être suffisants individuellement pour protéger les corticotropes contre l'induction par SF1.

4.2 Relations développementales entre les corticotropes et les mélanotropes

Dans l'introduction, j'ai fait état des observations qui suggèrent un lien entre les corticotropes et les mélanotropes, soit l'expression commune de *Dll3* et le mode de différenciation de mélanotropes dans l'axe ventro-dorsal, en plus bien sûr de l'expression de la POMC. Le fait que les cellules des lobes intermédiaires d'hypophyses *Tpit* *-/-* adoptent un destin cellulaire ventral (FSH, LH et TSH indépendant de *Pit1*) alors qu'elles sont en position dorsale suggère une certaine autonomie de développement de ces cellules ainsi qu'une origine ventrale des mélanotropes. Ceci renforce l'hypothèse d'un lien entre les corticotropes et les mélanotropes. Ces dernières commencent à se différencier au moment où

l'expression de la protéine NeuroD1 cesse et que les récepteurs au CRH commencent à être exprimés. Les premières mélanotropes sont-elles d'anciennes corticotropes qui acquièrent leur phénotype, comme l'expression de la PC2, suite à la perte de NeuroD1? D'autre part, il n'existe pas de cellules Tpit+, POMC+, NeuroD1- qui seraient des précurseurs potentiels des mélanotropes dans le lobe antérieur puisque nous n'y avons pas détecté d'expression de POMC lorsque NeuroD1 est inactivé (Lamolet et al., 2004). Par conséquent, lors de la différenciation des cellules mélanotropes, il y a soit une nouvelle induction de POMC à partir d'un *pool* de cellules POMC- et possiblement Tpit+, soit les mélanotropes sont d'anciennes cellules de la voie corticotrope. Une façon de trancher serait de voir si les mélanotropes apparaissent quand il n'y a pas de corticotropes. Expérimentalement, on pourrait détruire les corticotropes au moment même de leur différenciation en faisant exprimer une substance histotoxique comme la toxine diphtérique, sous contrôle du promoteur de NeuroD1. Les régions 5' de NeuroD1 sont disponibles et celles qui dirigent son expression dans le pancréas ont été identifiées (Xu and Murphy, 1998).

4.3 Induction de la voie corticotrope

Tpit et NeuroD1 sont les effecteurs de la différenciation terminale. Pour comprendre les étapes de la différenciation globale, il faudra identifier les acteurs en amont de ces facteurs de transcription. Notons ici que, contrairement à ce qui se

passé dans le système nerveux et le pancréas, l'expression de NeuroD1 ne dépend pas d'un facteur connu de la famille neurogénine (Lamolet et al., 2004). Par ailleurs, Tpit et NeuroD1 ne semblent pas s'activer l'un l'autre. Une première approche serait d'identifier des facteurs de transcription activateurs de Tpit et NeuroD1 en allant tout d'abord identifier les régions promotrices de ces gènes. On connaît déjà les séquences qui induisent l'expression de NeuroD1 dans le pancréas mais l'activité de ces séquences n'a pas encore été évaluée dans l'hypophyse (Xu and Murphy, 1998). On sait aussi que les 3 kb de région génomiques 5' en amont du site d'initiation de la transcription de Tpit sont insuffisantes pour induire l'expression de Tpit dans l'hypophyse. Dans les deux cas, plus de recherches sont requises.

L'autre approche consiste à tester des facteurs candidats. Ceux dont le rôle développemental sur l'hypophyse a été le plus étudié sont les BMPs et les FGFs. Ils ont un rôle répresseur sur la transcription de la POMC et serviraient donc à déterminer la région dans laquelle la différenciation des cellules POMC débute. Par exemple, dans notre laboratoire, Nudi et al (mémoire de thèse) ont montré que des facteurs Smad, activés par la voie BMP, pouvaient réprimer l'activation transcriptionnelle de la POMC par Pitx1.

En outre, les corticotropes apparaissent dans une région du lobe antérieur qui exprimait Isl1 dont l'expression doit être éteinte au préalable (Ericson et al., 1998). Le fait que Isl1 est activé par BMP2/4 suggère qu' Isl1 pourrait aussi être

impliqué dans la répression de la POMC. Sur le promoteur de l'insuline, les domaines LIM de Isl-1 interagissent avec le domaine bHLH de facteurs de transcription de type Pan (E2A) pour inhiber l'activation du gène de l'insuline (Thor et al., 1991). Transposé dans les progénitrices des pré-corticotropes de l'hypophyse, on pourrait penser à un mécanisme selon lequel Isl1, en liant le domaine bHLH de Pan1, empêcherait une certaine activation de la POMC par les facteurs non-spécifiques comme celle qui peut être observée en système hétérologue par Pan1 et Pitx1 (non publié). De plus, Isl1 pourrait peut-être aussi bloquer l'accès de Pan à Pitx1 et/ou NeuroD1. Ceci pourrait expliquer pourquoi Isl1 doit être réprimé pour que la POMC s'exprime (Ericson et al, 1998).

Faisons remarquer ici que les cellules POMC n'apparaissent pas au sein d'une population plus grande de cellules Tpit+ et NeuroD1+ dont une partie subirait l'influence négative des FGFs et des BMPs. En fait, il semble bien que toutes les cellules Tpit+, NeuroD1+ deviennent POMC+. Ceci suggère que Tpit et NeuroD1 antagoniseraient, dans les cellules qui les expriment, l'effet négatif des facteurs de croissance FGF et BMP. Dans le cas des BMPs, Nudi et al (mémoire de maîtrise) ont montré qu'il existait un antagoniste compétitif et une interaction physique entre les facteurs Smad, activés par la voie BMP, et Tpit. Ce dernier pourrait donc titrer les facteurs Smad avant d'interagir avec Pitx1 et participer à l'activation de la transcription de la POMC. Dans le cas impliquant Isl1, NeuroD1 pourrait contribuer à le déplacer de Pan1 pour permettre la synergie entre les facteurs bHLH et le couple Tpit /Pitx1. Tous ces mécanismes compétitifs

pourraient s'observer en transfection avec des courbes de dosage des différents facteurs avant d'être caractérisé plus en profondeur.

Le seul gène candidat connu qui pourrait avoir un rôle pro-corticotrope est Shh. Le blocage de l'action de Shh, par expression d'un antagoniste dans des souris transgéniques, cause un sous-développement de l'hypophyse dans laquelle la POMC n'est pas exprimée (Treier et al., 2001). Or, dans les hypophyses *Pitx2*^{-/-} et *Lhx3*^{-/-} qui présentent un niveau de sous-développement semblable, la POMC est détectée (Suh et al., 2002; Lin et al., 1999; Gage et al., 1999; Sheng et al., 1996). Shh aurait donc peut-être un rôle positif à jouer dans la différenciation des cellules POMC. D'ailleurs, la présence de quelques cellules POMC dans la région ventrale des hypophyses *NeuroD1*^{-/-} avant e15 suggère l'existence d'un facteur de croissance pro-corticotrope exprimé ventralement (Lamolet et al., 2004) et Shh est exprimé dans l'ectoderme oral sous l'hypophyse. Il serait intéressant de déterminer si les hypophyses d'animaux dont on a inactivé Shh ou bloqué son action expriment ou non *Tpit* et/ou *NeuroD1*. Cela permettrait de savoir à quel niveau la différenciation des corticotropes est bloquée. S'ils sont exprimés, cela indiquerait que Shh agit sur la différenciation terminale des corticotropes en parallèle avec *Tpit* et/ou *NeuroD1*. S'ils ne le sont pas, on pourrait émettre l'hypothèse qu'ils agissent en aval de Shh, si ce dernier a bien un rôle positif à jouer dans la différenciation des cellules corticotropes.

La possibilité d'une différenciation des corticotropes par un mécanisme d'exclusion latérale impliquant Dll3 et Notch2 est très intéressante. Encore une fois, puisque les cellules Tpit + et POMC+ sont les mêmes, c'est-à-dire que les cellules POMC n'apparaissent pas au sein d'une population de cellules Tpit+ plus grande, cela suggère que l'exclusion latérale agirait en amont de Tpit, et de NeuroD1 dans le cas des corticotropes. Les inactivations restreintes à l'hypophyse de Notch2, Dll3 et Dll1 qui semble exercer de la redondance avec Dll3 pourraient apporter des réponses à ces questions. À ce propos, une souris α -GSU-Cre, qui exprime donc la recombinaison cre dans toute l'hypophyse vers e10,5 – e11,5, est disponible (Zhao et al., 2001). En outre, Souza et al (2004) ont montré que Notch avait un effet répresseur sur la régulation transcriptionnelle de POMC. Cette répression est peut-être conjointe et/ou causée par une répression de Tpit et/ou NeuroD1. Les variations ou non de l'expression de Tpit et NeuroD1 en réponse à Notch pourraient être évaluées dans des cellules AtT-20, un modèle corticotrope, par protection à la RNase.

S'il y a un mécanisme d'exclusion latérale, celui-ci pourrait se produire indépendamment de la signalisation FGF, BMP et Shh (?). Toutefois, il se pourrait aussi que les facteurs BMP2/4, FGF8 et Shh agissent en amont en influençant l'équilibre entre Dll3 et Notch2. Par exemple, BMP2 et 4 pourraient favoriser l'expression de Notch dans la pointe rostrale et dans la région dorsale du lobe antérieur et restreindre ainsi l'expression de la POMC à la région ventrale où se différencient les corticotropes. Des souris dont l'action spécifique à l'hypophyse

des BMPs ou des FGFs aura été bloquée (par exemple : inactivation de leurs récepteurs dans l'hypophyse) seraient très utiles pour déterminer si ces facteurs de croissance influencent ou non un mécanisme d'exclusion latérale impliquant Dll3 et Notch2.

En résumé, le lieu de l'induction des cellules corticotropes serait le résultat d'effets antagonistes inhibiteurs dorsaux (FGF8, BMP4) et ventraux (BMP2) contre des activateurs ventraux (Shh?). Et dans cette région, un mécanisme d'exclusion latérale induirait les futures corticotropes en refusant à leurs voisins le même destin cellulaire.

4.4 Identification d'autres gènes-cibles de Tpit et NeuroD1

La question d'identifier les gènes-cibles de NeuroD1 dans les corticotropes s'applique bien évidemment aussi à Tpit à la différence qu'on pourrait s'attendre à ce que les cibles de Tpit soient communes aux mélanotropes et aux corticopes. Deux approches sont possibles. La première est l'identification des éléments génomiques liés par ces facteurs par co-immunoprécipitation de chromatine (CHIP). La deuxième est la préparation d'une micropuce entre l'ADNc de cellules corticotropes AtT-20 et l'ADNc de cellules du même type dans lesquelles on fait exprimer un ARN inhibiteur de Tpit et/ou NeuroD1.

4.5 Rôle développemental des corticotropes dépendantes de NeuroD1

Une fois que nous avons établi que NeuroD1 était requis pour la différenciation des corticotropes fœtales et que l'absence de ces corticotropes fœtales ne semble pas nuire à l'embryon, on peut se demander à quoi ces cellules servent dans l'organisme. Nous n'avons pas noté d'effet de l'ablation génique de NeuroD1 sur le développement de l'hypophyse, à part le retard d'apparition de la POMC dans le lobe antérieur (Lamolet et al, 2004). Les souris NeuroD1 $-/-$ meurent de symptômes diabétiques peu après la naissance (Naya et al., 1997) et les auteurs n'ont pas rapporté de symptômes liés à un manque de glucocorticoïdes. Une des raisons serait que la mère peut fournir des glucocorticoïdes aux fœtus (Muglia et al., 1995). Les effets d'un manque de glucocorticoïdes seront donc visibles à la deuxième génération. C'est ainsi que Muglia et al ont montré l'importance des glucocorticoïdes dans la maturation des poumons chez des souris CRH $-/-$, notamment dans l'induction de l'apoprotéine B du surfactant (Muglia et al., 1995).

On pourrait donc penser que la raison d'être des corticotropes fœtales dépendantes de NeuroD1 serait d'accumuler un grand nombre de granules de sécrétion d'ACTH qui pourraient être relâchés au besoin dès que le réseau sanguin est établi dans l'hypophyse et que la CRH peut circuler. En effet, à ce moment là, vers e15,0, il ne reste que peu de temps pour que les glucocorticoïdes soient

synthétisés et jouent leur rôle au niveau des poumons, par exemple. Mais si la mère peut fournir les glucocorticoïdes, on revient alors à la case départ. Même si Huang et al (2002) ont introduit la mutation NeuroD1 dans des souris de *background* génétique différent, ce qui entraîne un taux de survie significatif, on ne pourra pas évaluer l'importance de l'accumulation de POMC dépendante de NeuroD1 à la seconde génération, comme pour les souris CRH^{-/-}. En effet, comme l'inactivation de NeuroD1 cause seulement un retard dans l'apparition des corticotropes, les mères auront toujours de ces cellules pour produire de l'ACTH, induire la synthèse de glucocorticoïdes et en transférer aux foetus. Est-ce que l'accumulation de POMC procure aux souris un avantage par rapport au seul don de la mère? Par exemple, de meilleures chances de survie à la naissance dans un milieu naturel, contrairement au milieu contrôlé d'une cage de laboratoire?

Une autre hypothèse serait que l'activation transcriptionnelle de la POMC entre e12,5 et e15,5 ne soit pas le seul rôle de NeuroD1. NeuroD1 pourrait avoir à jouer un autre rôle, indépendant de l'activation transcriptionnelle de la POMC, mais essentiel au cours du développement hypophysaire. L'analyse de l'inactivation de NeuroD1 a montré que ce facteur n'était pas requis pour le développement des autres lignées (Lamolet et al., 2004), mais NeuroD1 pourrait être nécessaire pour plusieurs aspects de la différenciation des corticotropes elle-mêmes. Par exemple, NeuroD1 pourrait être nécessaire pour sortir les progénitrices des corticotropes du cycle cellulaire comme MyoD dans les myoblastes (Voir section 1.7.5.2). En son absence, cette sortie se ferait plus tard.

On connaît aussi d'autres gènes qui sont activés différemment entre les corticotropes et les mélanotropes comme les récepteurs aux facteurs de relâchements hypothalamiques et les enzymes convertase de la POMC. Nous n'avons étudié que l'expression de la POMC dans les souris *NeuroD1*^{-/-} et nous ne pouvons pas nous prononcer sur cette possibilité. Nous ne pouvons même pas exclure avec certitude que les cellules POMC du lobe antérieur qui apparaissent à e15,5 dans les hypophyses *NeuroD1*^{-/-} soient plus mélanotropes que corticotropes. Après tout, ces cellules apparaissent en même temps que les mélanotropes du lobe intermédiaire. Pour faire la différence, on pourrait déterminer les patrons d'expression de la PC2 ou du récepteur à la CRH dans ces hypophyses. L'identification d'autres gènes-cible de *NeuroD1* pourra nous donner des indices sur les rôles que *NeuroD1* peut jouer dans les cellules POMC en plus de la transcription de ce gène.

Dans cette même perspective, on peut aussi considérer une autre possibilité liée à la relation entre les gonadotropes et les corticotropes. L'antagonisme entre *Tpit* et *SF1* est essentiel pour établir le nombre de corticotropes, or le nombre de corticotropes est similaire dans les hypophyses sauvages *Tpit*^{+/+} et hétérozygotes *Tpit*^{+/-}, comme si *SF1* n'avait pu « profiter » de l'absence d'un allèle *Tpit*. On pourrait penser que l'antagonisme de *NeuroD1* envers *SF1* soit à même de compenser. Il y aurait donc une redondance fonctionnelle entre *NeuroD1* et *Tpit* pour antagoniser *SF1* et maintenir les corticotropes dans leur voie quand *SF1* est induit. Cette redondance serait d'autant plus importante que la fréquence d'allèles

mutés de Tpit est élevée dans la population, ce qui est difficile à estimer. À cet égard, il est pertinent de réaliser la colocalisation NeuroD1 (ou β -galactosidase) - SF1 dans des hypophyses Tpit -/- pour savoir si les cellules NeuroD1 sont devenues néo-gonadotropes ou si elles sont restées pré-corticotropes.

Il ne semble pas y avoir de rôle majeur évident pour NeuroD1 et les pré-corticotropes dans l'organisme. J'ai soulevé quelques possibilités qui ne s'excluent pas et qui feraient peut-être une différence dans un milieu sauvage. Évidemment, si la transmission de glucocorticoïdes à travers la barrière placentaire était un phénomène restreint seulement à certaines espèces comme les rongeurs, l'accumulation de granules d'ACTH dans les corticotropes fœtales deviendrait essentielle pour les autres mammifères.

4.6 Intégration des régulations histospécifique et hormonale de la POMC

Des développements récents au laboratoire à propos de l'activation du gène de la POMC par la CRH en provenance de l'hypothalamus a permis d'identifier Tpit comme une autre cible activée par les des voies de signalisation de la CRH (Maira et al., 2003a). En plus, Tpit interagit aussi avec Nur77, une autre cible de la CRH, pour activer la transcription de POMC avec l'implication de co-facteurs de la famille SRC. Par contre, cette activation de Tpit par la CRH ne peut pas être bloquée ou inhibée par les glucocorticoïdes dans la boucle de rétroaction négative.

Cette implication de Tpit dans la signalisation hormonale est la première étape de l'unification de deux aspects majeurs de la transcription de POMC, soit l'historicité et la régulation hormonale et confère à Tpit un rôle central dans la transcription de la POMC.

On doit toutefois noter qu'il existe une transcription de la POMC dépendante de Tpit avant la possibilité d'activation transcriptionnelle par la CRH. En effet, Tpit active la transcription de la POMC à partir de e12,5 alors que la vascularisation de l'hypophyse permettant l'apport de CRH et la détection du récepteur à la CRH commence aux alentours de e15. Et cette activité transcriptionnelle pré-CRH et indépendante des glucocorticoïdes devrait constituer un problème chez l'adulte dans le cadre de la régulation hormonale puisqu'elle est forte et qu'elle subsisterait en présence de glucocorticoïdes dans un contexte physiologique où la répression de la POMC serait requise. Ceci, avec le fait qu'on ne détecte plus la protéine NeuroD1 aussi à partir de e15, m'amène à proposer qu'il y aurait, dans les corticotropes foetales, une transcription constitutive de la POMC où l'activation par Tpit/Pitx1 serait augmentée par un hétérodimère de facteurs bHLH contenant NeuroD1. Puis, dans les corticotropes définitives, à partir de e15, cette activation constitutive céderait la place à une activation régulée hormonalement dans laquelle Tpit/Pitx1 est assisté par Nur77. Ces trois facteurs interagiraient en présence de CRH, mais il ne subsisterait qu'une activité de base de Tpit/Pitx1 en présence de glucocorticoïdes. Dans le cadre de l'hypothèse du remplacement de la synthèse fœtale constitutive de la POMC par une synthèse

contrôlée hormonalement, il n'est plus nécessaire que NeuroD1 soit remplacé par un autre facteur bHLH et l'élément E box_{neuro} n'est requis que dans les corticotropes précoces et pas chez l'adulte. Ceci est vérifiable par l'introduction d'une mutation dans cet élément, ce qui perturberait l'expression d'un gène rapporteur dans des souris transgéniques adultes alors qu'une mutation dans le NurRE ne perturberait la synthèse de la POMC que dans les corticotropes définitives.

4.7 Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse illustrent très bien l'apport de la biologie moléculaire à l'embryologie et la pertinence de poser certaines questions embryologiques en termes de régulation génique. L'étude de la régulation transcriptionnelle du gène de la POMC dans les cellules corticotropes a mené à l'identification des facteurs de transcription Tpit et NeuroD1. Ces facteurs d'expression restreinte interagissent avec le facteur pan-hypophysaire Pitx1 au sein d'un complexe histo-spécifique pour activer le gène de la POMC dans la lignée corticotrope de l'hypophyse (voir Fig. 3.1 D). Et nous avons montré par la suite que l'activation du gène de la POMC dans l'hypophyse à e12,5 qui marque le début de la différenciation corticotrope, dépendait entièrement de Tpit et NeuroD1. Autrement dit, à l'échelle de l'organisme, le rôle transcriptionnel de ces deux facteurs devient un rôle développemental. La question qui se pose maintenant est

de placer la différenciation des cellules corticotropes dans le contexte de la différenciation hypophysaire. Pour y répondre, il faudra identifier les mécanismes moléculaires de détermination spécifiques aux corticotropes, soit les voies d'activation de Tpit et NeuroD1.

BIBLIOGRAPHIE

- Agulnik,S.I., Papaioannou,V.E., and Silver,L.M. (1998). Cloning, mapping, and expression analysis of TBX15, a new member of the T-Box gene family. *Genomics* 51, 68-75.
- Alward,W.L., Semina,E.V., Kalenak,J.W., Heon,E., Sheth,B.P., Stone,E.M., and Murray,J.C. (1998). Autosomal dominant iris hypoplasia is caused by a mutation in the Rieger syndrome (RIEG/PITX2) gene. *Am. J. Ophthalmol.* 125, 98-100.
- Ang,S.L. and Rossant,J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78, 561-574.
- Asteria,C., Oliveira,J.H.A., Abucham,J., and Beck-Peccoz,P. (2000). Central hypocortisolism as part of combined pituitary hormone deficiency due to mutations of PROP-1 gene. *Eur. J. Endocrinol.* 143, 347-352.
- Bach,I., Carriere,C., Ostendorff,H.P., Andersen,B., and Rosenfeld,M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* 11, 1370-1380.
- Bamshad,M., Le,T., Watkins,W.S., Dixon,M.E., Kramer,B.E., Roeder,A.D., Carey,J.C., Root,S., Schinzel,A., Van Maldergem,L., Gardner,R.J., Lin,R.C., Seidman,C.E., Seidman,J.G., Wallerstein,R., Moran,E., Sutphen,R., Campbell,C.E., and Jorde,L.B. (1999). The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1550-1562.
- Bamshad,M., Lin,R.C., Law,D.J., Watkins,W.S., Krakowiak,P.A., Moore,M.E., Franceschini,P., Lala,R., Holmes,L.B., Gebuhr,T.C., Bruneau,B.G., Schinzel,A., Seidman,J.G., Seidman,C.E., and Jorde,L.B. (1997). Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nature Genetics* 16, 311-315.
- Basson,C.T., Bachinsky,D.R., Lin,R.C., Levi,T., Elkins,J.A., Soultz,J., Grayzel,D., Kroumpouzou,E., Traill,T.A., Leblanc-Straceski,J., Renault,B., Kucherlapati,R., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* 15, 30-35.
- Basson,C.T., Huang,T., Lin,R.C., Bachinsky,D.R., Weremowicz,S., Vaglio,A., Bruzzone,R., Quadrelli,R., Lerone,M., Romeo,G., Silengo,M., Pereira,A., Krieger,J., Mesquita,S.F., Kamisago,M., Morton,C.C., Pierpont,M.E., Muller,C.W., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (1999). Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2919-2924.

- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., and Karin, M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55, 505-518.
- Bodner, M. and Karin, M. (1987). A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of non-expressing cells. *Cell* 50, 267-275.
- Bollag, R.J., Siegfried, Z., Cebra-Thomas, J.A., Garvey, N., Davison, E.M., Silver, and LM. (1994). An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. *Nat. Genet.* 7, 383-389.
- Bradford, A.P., Conrad, K.E., Wasylyk, C., Wasylyk, B., and Gutierrez-Hartmann, A. (1995). Functional interaction of c-Ets-1 and GHF-1/Pit-1 mediates Ras activation of pituitary-specific gene expression: mapping of the essential c-Ets-1 domain. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2849-2857.
- Bradford, A.P., Wasylyk, C., Wasylyk, B., and Gutierrez-Hartmann, A. (1997). Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression 7626. *Mol. Cell Biol.* 17, 1065-1074.
- Braybrook, C., Doudney, K., Marcano, A.C.B., Amason, A., Bjornsson, A., Patton, M.A., Goodfellow, P.J., Moore, G.E., and Stanier, P. (2001). The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nature Genetics* 29, 179-183.
- Braybrook, C., Lisgo, S., Doudney, K., Henderson, D., Marcano, A.C.B., Strachan, T., Patton, M.A., Villard, L., Moore, G.E., Stanier, P., and Lindsay, S. (2002). Craniofacial expression of human and murine TBX22 correlates with the cleft palate and ankyloglossia phenotype observed in CPx patients. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2793-2804.
- Bruneau, B.G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D.A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106, 721.
- Bulfone, A., Smiga, S.M., Shimamura, K., Peterson, A., Puellas, L., and Rubenstein, J.L. (1995). T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15, 63-78.
- Camper, S.A., Saunders, T.L., Katz, R.W., and Reeves, R.H. (1990). The Pit-1 Transcription Factor Gene Is A Candidate for the Murine Snell Dwarf Mutation. *Genomics* 8, 586-590.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., and Blum, M.

(1999). The homeobox gene *Ptx2*: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* *126*, 1225-1234.

Carreira,S., Dexter,T.J., Yavuzer,U., Easty,D.J., and Goding,C.R. (1998). Brachyury-related transcription factor *Tbx2* and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5099-5108.

Casey,E.S., O'Reilly,M.A., Conlon,F.L., and Smith,J.C. (1998). The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. *Development* *125*, 3887-3894.

Casey,E.S., Tada,M., Fairclough,L., Wylie,C.C., Heasman,J., and Smith,J.C. (1999). *Bix4* is activated directly by *VegT* and mediates endoderm formation in *Xenopus* development. *Development* *126*, 4193-4200.

Chapman,D.L. and Papaioannou,V.E. (1998). Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* *391*, 695-697.

Cohen,L.E. and Radovick,S. (2002). Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr. Rev.* *23*, 431-442.

Coll,M., Seidman,J.G., and Muller,C.W. (2002). Structure of the DNA-bound T-box domain of human *TBX3*, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome. *Structure* *10*, 343-356.

Conlon,F.L., Fairclough,L., Price,B.M.J., Casey,E.S., and Smith,J.C. (2001). Determinants of T box protein specificity. *Development* *128*, 3749-3758.

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

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

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

Daikoku,S., Chikamori,M., Adachi,T., and Maki,Y. (1982). Effect of the basal diencephalon on the development of Rathke's pouch in rats: a study in combined organ cultures. *Dev. Biol.* *90*, 198-202.

Dasen,J.S., O'Connell,S.M., Flynn,S.E., Treier,M., Gleiberman, AS, Szeto,D.P., Hooshmand,F., Aggarwal,A.K., and Rosenfeld,M.G. (1999). Reciprocal

interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97, 587-598.

Dasen, J.S. and Rosenfeld, M.G. (2001). Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 327-355.

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

del Giudice, E.M., Cirillo, G., Nigro, V., Santoro, N., D'Urso, L., Raimondo, P., Cozzolino, D., Scafato, D., and Perrone, L. (2002). Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *International Journal of Obesity* 26, 647-651.

Di Gregorio, A. and Levine, M. (1999). Regulation of Ci-tropomyosin-like, a Brachyury target gene in the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development* 126, 5599-5609.

Dobrovolskaïa-Zavadskaa N. Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère héréditaire "non-viable". *C R Soc Biol* 97, 114-116. 1927.

Ref Type: Generic

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

Dubern, B., Clement, K., Pelloux, V., Froguel, P., Girardet, J.P., Guy-Grand, B., and Tounian, P. (2001). Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *Journal of Pediatrics* 139, 204-209.

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

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

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

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.

Gage, P.J., Brinkmeier, M.L., Scarlett, L.M., Knapp, L.T., Camper, S.A., and Mahon, K.A. (1996). The ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 10, 1570-1581.

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

Gage, P.J., Suh, H.Y., and Camper, S.A. (1999). Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* 126, 4643-4651.

Gaiano, N. and Fishell, G. (2002). The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 471-490.

Gallardo, M.E., Lopez-Rios, J., Fernaud-Espinosa, I., Granadino, B., Sanz, R., Ramos, C., Ayuso, C., Seller, M.J., Brunner, H.G., Bovolenta, P., and de Cordoba, S.R. (1999). Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene *SIX6* reveals a cluster of *SIX* genes in chromosome 14 and associates *SIX6* hemizygoty with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics* 61, 82-91.

Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.

Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Chapman, D.L., Alexiou, M., Garvey, N., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. (1996). Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech. Dev.* 56, 93-101.

Gibson-Brown, J.J., Agulnik, S.I., Silver, L.M., Niswander, L., and Papaioannou, V.E. (1998). Involvement of T-box genes *Tbx2-Tbx5* in vertebrate limb specification and development. *Development* 125, 2499-2509.

Gothé, S., Wang, Z.D., Ng, L., Kindblom, J.M., Barros, A.C., Ohlsson, C., Vennstrom, B., and Forrest, D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes & Development* 13, 1329-1341.

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

Guyton, A. C. Textbook of medical physiology, 8th ed., 1990, Saunders, Montreal.

Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J.R., and Tsujimoto, Y. (1999). Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126, 3415-3424.

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

Hassan, B.A. and Bellen, H.J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.* 14, 1852-1865.

He, M., Wen, L., Campbell, C.E., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Transcription repression by Xenopus ET and its human ortholog TBX3, a gene involved in ulnar-mammary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10212-10217.

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. et Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.

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

Herrmann, B.G., Labeit, S., Poustka, A., King, T.R., and Lehrach, H. (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-622.

Hirsch, J.A. and Aggarwal, A.K. (1995). Structure of the even-skipped homeodomain complexed to AT-rich DNA: new perspectives on homeodomain specificity. *EMBO J.* 14, 6280-6291.

Hjalt, T.A., Semina, E.V., Amendt, B.A., and Murray, J.C. (2000). The Pitx2 protein in mouse development. *Dev. Dynamics* 218, 195-200.

Huang, H.P., Chu, K., Nemoz-Gaillard, E., Elberg, D., and Tsai, M.J. (2002). Neogenesis of beta-cells in adult BETA2/NeuroD-deficient mice. *Mol. Endocrinol.* 16, 541-551.

Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.

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

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

Jackson,R.S., Creemers,J.W., Ohagi,S., Raffin-Sanson,M.L., Sanders,L., Montague,C.T., Hutton,J.C., and O'Rahilly,S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* 16, 303-306.

Jacobs,J.J., Keblusek,P., Robanus-Maandag,E., Kristel,P., Lingbeek,M., Nederlof,P.M., van Welsem,T., van de Vijver,M.J., Koh,E.Y., Daley,G.Q., and van Lohuizen,M. (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat. Genet.* 26, 291-299.

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

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

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

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

Jerome,L.A. and Papaioannou,V.E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.* 27, 286-291.

Johnson,J.E., Zimmerman,K., Saito,T., and Anderson,D.J. (1992). Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 114, 75-87.

Kariagin, A., Ware, C., and Chesnokova, V. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Receptor Signaling Is Essential for Functioning of the Neonatal HPA Axis. The Endocrine Society 85th Annual Meeting, Philadelphia USA, Abstracts , 112. 6-22-2003.

Ref Type: Conference Proceeding

Kaufman,M.H. (1992). *The Atlas of Mouse Development.* (San Diego USA: Academic Press), pp. 1-525.

Kikuyama,S., Inaco,H., Jenks,B.G., and Kawamura,K. (1993). Development of the ectopically transplanted primordium of epithelial hypophysis (anterior neural ridge) in *Bufo japonicus* embryos. *J. Exp. Zool.* *266*, 216-220.

Kimura,S., Hara,Y., Pineau,T., Fernandez-Salguero,P., Fox,C.H., Ward,J.M., and Gonzalez,F.J. (1996). The *T/ebp* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* *10*, 60-69.

Kioussi,C., O'Connell,S., St Onge,L., Treier,M., Gleiberman,A.S., Gruss,P., and Rosenfeld,M.G. (1999). Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 14378-14382.

Kispert,A. and Herrmann,B.G. (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* *12*, 4898-4899.

Kispert,A., Koschorz,B., and Herrmann,B.G. (1995). The T protein encoded by *Brachyury* is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J.* *14*, 4763-4772.

Kissinger,C.R., Liu,B.S., Martin-Blanco,E., Kornberg,T.B., and Pabo,C.O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* *63*, 579-590.

Kitamura,K., Miura,H., Miyagawa-Tomita,S., Yanazawa,M., Katoh-Fukui,Y., Suzuki,R., Ohuchi,H., Suehiro,A., Motegi,Y., Nakahara,Y., Kondo,S., and Yokoyama,M. (1999). Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, e. *Development* *126*, 5749-5758.

Knezevic,V., De Santo,R., and Mackem,S. (1997). Two novel chick T-box genes related to mouse Brachyury are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development* *124*, 411-419.

Kobayashi,H., Ogawa,Y., Shintani,M., Ebihara,K., Shimodahira,M., Iwakura,T., Hino,M., Ishihara,T., Ikekubo,K., Kurahachi,H., and Nakao,K. (2002). A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes* *51*, 243-246.

Krude,H., Biebermann,H., Luck,W., Horn,R., Brabant,G., and Gruters,A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* *19*, 155-157.

Krude,H. and Gruters,A. (2000). Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol. Metab* *11*, 15-22.

Kyllo,J.H., Collins,M.M., Vetter,K.L., Cuttler,L., Rosenfield,R.L., and Donohoue,P.A. (1996). Linkage of congenital isolated adrenocorticotrophic

hormone deficiency to the corticotropin releasing hormone locus using simple sequence repeat polymorphisms. *Am. J. Med. Genet.* *62*, 262-267.

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

Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., Brue,T., Enjalbert,A., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* *104*, 849-859.

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

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

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

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

Law,D.J., Garvey,N., Agulnik,S.I., Perlroth,V., Hahn,O.M., Rhinehart,R.E., Gebuhr,T.C., and Silver,L.M. (1998). TBX10, a member of the Tbx1-subfamily of conserved developmental genes, is located at human chromosome 11q13 and proximal mouse chromosome 19. *Mamm. Genome* *9*, 397-399.

Lazzaro,D., Price,M., De Felice,M., and Di Lauro,R. (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* *113*, 1093-1104.

Lebel,M., Gauthier,Y., Moreau,A., and Drouin,J. (2001). Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high affinity binding site. *J. Neurochem.* *76*, 1-11.

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

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

Li, B., Yang, P., Zhou, H., Zhang, Z., Xie, C., Lin, X., Huang, X., and Kijlstra, A. (2003). T-bet expression is upregulated in active Behcet's disease. *British Journal of Ophthalmology* 87, 1264-1267.

Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H., Gebuhr, T., Bullen, P.J., Robson, S.C., Strachan, T., Bonnet, D., Lyonnet, S., Young, I.D., Raeburn, J.A., Buckler, A.J., Law, D.J., and Brook, J.D. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat. Genet.* 15, 21-29.

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

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

Lindsay, E.A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H.F., Scambler, P.J., Bradley, A., and Baldini, A. (2001). Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410, 97-101.

Liu, J., Lin, C., Gleiberman, A., Ohgi, K.A., Herman, T., Huang, H.P., Tsai, M.J., and Rosenfeld, M.G. (2001). Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8674-8679.

Liu, M., Pleasure, S.J., Collins, A.E., Noebels, J.L., Naya, F.J., Tsai, M.J., and Lowenstein, D.H. (2000). Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5679]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 865-870.

Lo, L.C., Johnson, J.E., Wuenschell, C.W., Saito, T., and Anderson, D.J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* 5, 1524-1537.

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

Logan, M., Simon, H.G., and Tabin, C. (1998b). Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development* 125, 2825-2835.

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

Lu,D., Willard,D., Patel,I.R., Kadwell,S., Overton,L., Kost,T., Luther,M., Chen,W., Woychik,R.P., Wilkison,W.O., and et al (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating- hormone receptor. *Nature* 371, 799-802.

Lu,M.F., Pressman,C., Dyer,R., Johnson,R.L., and Martin,J.F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 401, 276-278.

Ma,Q., Chen,Z., del,B.B., I, de la Pompa,J.L., and Anderson,D.J. (1998). Neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482.

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

Ma,Q., Sommer,L., Cserjesi,P., and Anderson,D.J. (1997). Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J. Neurosci.* 17, 3644-3652.

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

MacNeil,D.J., Howard,A.D., Guan,X.M., Fong,T.M., Nargaund,R.P., Bednarek,M.A., Goulet,M.T., Weinberg,D.H., Strack,A.M., Marsh,D.J., Chen,H.Y., Shen,C.P., Chen,A.S., Rosenblun,C.I., MacNeil,T., Tota,M., MacIntyre,E.D., and van der Ploeg,L.H.T. (2002). The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity (vol 440, pg 141, 2001). *Eur. J. Pharmacol.* 450, 91-+.

Maira,M.H., Couture,C., Le Martelot,G., Pulichino,A.M., Bilodeau,S., and Drouin,J. (2003a). The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 coactivators and mediates hormone action. *J Biol Chem* 278, 46523-46532.

Maira,M.H., Martens,C., Batsche,E., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2003b). Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 23, 763-776.

Maira,M.H., Martens,C., Philips,A., and Drouin,J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7549-7557.

Malpuech,G., Vanlieferinghen,P., Dechelotte,P., Gaulme,J., Labbe,A., and Guiot,F. (1988). Isolated familial adrenocorticotropin deficiency: prenatal diagnosis by maternal plasma estriol assay. *Am. J. Med. Genet.* 29, 125-130.

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

Marcil, A., Dumontier, É., Chamberland, M., Camper, S.A., and Drouin, J. (2003). *Pitx1* and *Pitx2* are required for development of hindlimb buds. *Development* *130*, 45-55.

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

Martens, C., Maira, M.H., Bilodeau, S., Gauthier, Y., and Drouin, J. (2004). Protein:protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* *Submitted*.

McCright, B., Lozier, J., and Gridley, T. (2002). A mouse model of Alagille syndrome: *Notch2* as a genetic modifier of *Jag1* haploinsufficiency. *Development* *129*, 1075-1082.

Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., Tokooya, K., Jore, B.S., Lopez, M., Pandita, R.K., Lia, M., Carrion, D., Xu, H., Schorle, H., Kobler, J.B., Scambler, P., Wynshaw-Boris, A., Skoultschi, A.I., Morrow, B.E., and Kucherlapati, R. (2001). *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* *104*, 619-629.

Meyers, E.N., Lewandoski, M., and Martin, G.R. (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics* *18*, 136-141.

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

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

Mucchielli, M.L., Mitsiadis, T.A., Raffo, S., Brunet, J.F., Proust, J.P., and Goridis, C. (1997). Mouse *Otx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signal for its maintenance. *Dev. Biol.* *189*, 275-284.

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

Muller,C.W. and Herrmann,B.G. (1997). Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* 389, 884-888.

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

Mutoh,H., Naya,F.J., Tsai,M.J., and Leiter,A.B. (1998). The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev.* 12, 820-830.

Naya,F.J., Huang,H.P., Qiu,Y., Mutoh,H., DeMayo,F.J., Leiter,A.B., and Tsai,M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 11, 2323-2334.

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

Netchine, I., Sobrier,M.L., Krude,H., Schnabel,D., Maghnie,M., Marcos,E., Duriez,B., Cacheux,V., Moers,A., Goossens,M., Gruters,A. and Amselem,S. (2000) Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* 25 , 182-186

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

Olson,E.C., Schinder,A.F., Dantzker,J.L., Marcus,E.A., Spitzer,N.C., and Harris,W.A. (1998). Properties of ectopic neurons induced by Xenopus neurogenin1 misexpression. *Mol. Cell. Neurosci.* 12, 281-299.

Palomino,T., Baretino,D., and Aranda,A. (1998). Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors
7625. *J. Biol. Chem.* 273, 27541-27547.

Papaiouannou,V.E. (2001). T-box genes in development: from hydra to humans. *Int. Rev. Cytol.* 207, 1-70.

Pernasetti,F., Toledo,S.P.A., Vasilyev,V.V., Hayashida,C.Y., Cogan,J.D., Ferrari,C., Lourenco,D.M., and Mellon,P.L. (2000). Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the Prophet of Pit-1 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 390-397.

- Pfaff, S.L., Mendelsohn, M., Stewart, C.L., Edlund, T., Jessell, and T.M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84, 309-320.
- Pflugfelder, G.O., Roth, H., and Poeck, B. (1992). A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse *Brachyury* is involved in DNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 918-925.
- Philips, A., Maira, M.H., Mullick, A., Chamberland, M., Lesage, S., Hugo, P., and Drouin, J. (1997). Antagonism between *Nur77* and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5952-5959.
- Piedra, M.E., Icardo, J.M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J.C., and Ros, M.A. (1998). *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 94, 319-324.
- Poulin, G., Lebel, M., Chamberland, M., Paradis, F.W., and Drouin, J. (2000). Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the *Pitx* family. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4826-4837.
- Poulin, G., Turgeon, B., and Drouin, J. (1997). *NeuroD1/BETA2* contributes to cell-specific transcription of the *POMC* gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6673-6682.
- Pulichino, A.M., Vallette-Kasic, S., Couture, C., Gauthier, Y., Brue, T., David, M., Malpuech, G., Deal, C., Van Vliet, G., De Vroede, M., Riepe, F.G., Partsch, C.J., Sippell, W.G., Berberoglu, M., Atasay, B., and Drouin, J. (2003a). Human and mouse *Tpit* gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 17, 711-716.
- Pulichino, A.M., Vallette-Kasic, S., and Drouin, J. (2004). Transcriptional regulation of pituitary gland development: binary choices for cell differentiation. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 11, 13-17.
- Pulichino, A.M., Vallette-Kasic, S., Tsai, J.P.Y., Couture, C., Gauthier, Y., and Drouin, J. (2003b). *Tpit* determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* 17, 738-747.
- Qiu, Y., Sharma, A., and Stein, R. (1998). p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2957-2964.
- Raetzman, L.T., Ross, S.A., Cook, S., Dunwoodie, S.L., Camper, S.A., and Thomas, P.Q. (2004). Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: *Prop1* deficiency affects *Notch2* expression. *Dev. Biol.* 265, 329-340.

Raetzman,L.T., Ward,R., and Camper,S.A. (2002). Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. *Development* 129, 4229-4239.

Ray,D.W., Ren,S.G., and Melmed,S. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J. Clin. Invest* 97, 1852-1859.

Reichardt,H.M. and Schutz,G. (1996). Feedback control of glucocorticoid production is established during fetal development. *Molecular Medicine* 2, 735-744.

Rodriguez-Esteban,C., Tsukui,T., Yonei,S., Magallon,J., Tamura,K., and Izpisua Belmonte,J.C. (1999). The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* 398, 814-818.

Rosmond,R., Chagnon,M., Bouchard,C., and Bjorntorp,P. (2001). A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia* 44, 1335-1338.

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

Ruvinsky,I., Silver,L.M., and Gibson-Brown,J.J. (2000). Phylogenetic analysis of T-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome. *Genetics* 156, 1249-1257.

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

Schmeichel,K.L. and Beckerle,M.C. (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 79, 211-219.

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

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

Schwitzgebel,V.M., Scheel,D.W., Connors,J.R., Kalamaras,J., Lee,J.E., Anderson,D.J., Sussel,L., Johnson,J.D., and German,M.S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127, 3533-3542.

- Scully,K.M., Gleiberman,A.S., Lindzey,J., Lubahn,D.B., Korach,K.S., and Rosenfeld,M.G. (1997). Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* *11*, 674-681.
- Seidah,N.G., Marcinkiewicz,M., Benjannet,S., Gaspar,L., Beaubien,G., Mattei,M.G., Lazure,C., Mbikay,M., and Chrétien,M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. Endocrinol.* *5*, 111-122.
- Semina,E.V., Ferrell,R.E., Mintz-Hittner,H.A., Bitoun,P., Alward,W.L.M., Reiter,R.S., Funkhauser,C., Daack-Hirsch,S., and Murray,J.C. (1998). A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat. Genet.* *19*, 167-170.
- Semina,E.V., Reiter,R., Leysens,N.J., Alward,W.L., Small,K.W., Datson,N.A., Siegel-Bartelt,J., Bierke-Nelson,D., Bitoun,P., Zabel,B.U., Carey,J.C., and Murray,J.C. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat. Genet.* *14*, 392-399.
- Semina,E.V., Reiter,R.S., and Murray,J. (1997). Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 2109-2116.
- Shang,J., Luo,Y., and Clayton,D.A. (1997). Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev. Dynamics* *209*, 242-253.
- Sharma,A., Moore,M., Marcora,E., Lee,J.E., Qiu,Y., Samaras,S., and Stein,R. (1999). The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 704-713.
- Sheng,H.Z., Moriyama,K., Yamashita,T., Li,H., Potter,S.S., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1997). Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* *278*, 1809-1812.
- Sheng,H.Z., Zhadanov,A.B., Mosinger,B., Fujii,T., Bertuzzi,S., Grinberg,A., Lee,E.J., Huang,S.P., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* *272*, 1004-1007.
- Simmons,D.M., Voss,J.W., Ingraham,H.A., Holloway,J.M., Broide,R.S., Rosenfeld,M.G., and Swanson,L.W. (1990). Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* *4*, 695-711.

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

Smith,G.W., Aubry,J.M., Dellu,F., Contarino,A., Bilezikjian,L.M., Gold,L.H., Chen,R.P., Marchuk,Y., Hauser,C., Bentley,C.A., Sawchenko,P.E., Koob,G.F., Vale,W., and Lee,K.F. (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* *20*, 1093-1102.

Smith, P. E. Experimental ablation of the hypophysis in the frog embryo. *Science* *44*, 280-282. 1-1-1916.

Soo,S.C., Bain,M., Gibson,S., White,A., Johnstone,A.P., and Nussey,S. (1994). Isolated congenital ACTH deficiency: a cleavage enzyme defect? *Clin. Endocrinol.* *40*, 555-556.

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

Souaze et al, (2004) *Molecular Endocrinology*, sous presse.

St-Johnston,D. and Nüsslein-Volhard,C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* *68*, 201-219.

Stefana,B., Ray,D.W., and Melmed,S. (1996). Leukemia inhibitory factor induces differentiation of pituitary corticotroph function: an immuno-neuroendocrine phenotypic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 12502-12506.

Stott,D., Kispert,A., and Herrmann,B.G. (1993). Rescue of the tail defect of Brachyury mice. *Genes Dev.* *7*, 197-203.

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

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

Szabo,S.J., Kim,S.T., Costa,G.L., Zhang,X., Fathman,C.G., and Glimcher,L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655-669.

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

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

Takeuchi,J.K., Koshiba-Takeuchi,K., Matsumoto,K., Vogel-Hopker,A., Naitoh-Matsuo,M., Ogura,K., Takahashi,N., Yasuda,K., and Ogura,T. (1999). Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* *398*, 810-814.

Takuma,N., Sheng,H.Z., Furuta,Y., Ward,J.M., Sharma,K., Hogan,B.L., Pfaff,S.L., Westphal,H., Kimura,S., and Mahon,K.A. (1998). Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* *125*, 4835-4840.

Tan,Y.J., Costa,R.H., Kovesdi,I., and Reichel,R.R. (2001). Adenovirus-mediated increase of HNF-3 levels stimulates expression of transthyretin and sonic hedgehog, which is associated with F9 cell differentiation toward the visceral endoderm lineage. *Gene Expr.* *9*, 237-248.

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

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

Thor,S., Ericson,J., Brannstrom,T., and Edlund,T. (1991). The Homeodomain Lim Protein Isl-1 Is Expressed in Subsets of Neurons and Endocrine-Cells in the Adult-Rat. *Neuron* *7*, 881-889.

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

Topilko,P., Schneider-Maunoury,S., Levi,G., Trembleau,A., Gourdji,D., Driancourt,M.A., Rao,C.V., and Charnay,P. (1998). Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol. Endocrinol.* *12*, 107-122.

Treier,M., Gleiberman,A.S., O'Connell,S.M., Szeto,D.P., McMahan,J.A., McMahan,A.P., and Rosenfeld,M.G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* *12*, 1691-1704.

Treier,M., O'Connell,S., Gleiberman,A., Price,J., Szeto,D.P., Burgess,R., Chuang,P.T., McMahon,A.P., and Rosenfeld,M.G. (2001). Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 128, 377-386.

Treisman,J., Harris,E., and Desplan,C. (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev.* 5, 594-604.

Tremblay,J.J. and Drouin,J. (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2567-2576.

Tremblay,J.J., Goodyer,C.G., and Drouin,J. (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol.* 71, 277-286.

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

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

Valette-Kasic,S., Figarella-Branger,D., Grino,M., Pulichino,A.M., Dufour,H., Grisoli,F., Enjalbert,A., Drouin,J., and Brue,T. (2003). Differential regulation of proopiomelanocortin and pituitary-restricted transcription factor (TPIT), a new marker of normal and adenomatous human corticotrophs. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 3050-3056.

Valverde,P., Healy,E., Jackson,I., Rees,J.L., and Thody,A.J. (1995). Variants of the Melanocyte-Stimulating Hormone-Receptor Gene Are Associated with Red Hair and Fair Skin in Humans. *Nature Genetics* 11, 328-330.

van den Munckhof,P., Luk,K.C., Sainte-Marie,L., Montgomery,J., Blanchet,P.J., Sadikot,A.F., and Drouin,J. (2003). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130, 2535-2542.

Walsh,K. and Perlman,H. (1997). Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 597-602.

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

Weinstein,D.C., Ruiz, Chen,W.S., Hoodless,P., Prezioso,V.R., Jessell,T.M., and Darnell,J.E.J. (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78, 575-588.

- Wilkinson,D.G., Bhatt,S., and Herrmann,B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-659.
- Wolberger,C., Vershon,A.K., Liu,B., Johnson,A.D., and Pabo,C.O. (1991). Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67, 517-528.
- Woollard,A. and Hodgkin,J. (2000). The *Caenorhabditis elegans* fate-determining gene *mab-9* encodes a T-box protein required to pattern the posterior hindgut. *Genes & Development* 14, 596-603.
- Xu,W.Z. and Murphy,L.J. (1998). Isolation and characterization of Beta2/NeuroD gene promoter. *Diabetes* 47, A413.
- Yoshioka,H., Meno,C., Koshiba,K., Sugihara,M., Itoh,H., Ishimaru,Y., Inoue,T., Ohuchi,H., Semina,E.V., Murray,J.C., Hamada,H., and Noji,S. (1998). *Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 94, 299-305.
- Zhang,J. and King,M.L. (1996). *Xenopus* VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development* 122, 4119-4129.
- Zhao,L., Bakke,M., Krimkevich,Y., Cushman,L.J., Parlow,A.F., Camper,S.A., and Parker,K.L. (2001). Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128, 147-154.

Annexes

Annexe I :

Comparaison des patrons d'expression de Pitx1 dans les stomodeums chez la souris et le poulet

I.1 Introduction

Le facteur de transcription Pitx1 a d'abord été identifié comme activateur du gène POMC dans l'hypophyse. Et bien qu'il contribue à l'expression histospécifique de la POMC, son expression pan-pituitaire suggère un rôle parallèle dans le développement de la glande. J'ai donc déterminé le patron d'expression de Pitx1 dans le tissu donnant naissance à la poche de Rathke, c'est à dire l'ectoderme oral ou le stomodeum, chez la souris et chez le poulet. Ces résultats ont été rapportés ailleurs (Lancôt et al., 1997).

I.2 Résultats et discussion

J'ai examiné l'expression de Pitx1 à e9,5 quand la poche de Rathke se forme par hybridation *whole mount*. J'ai aussi détecté l'expression de Pitx1 dans le stomodeum, de la hauteur de l'œil jusqu'à la base du premier arc branchial. Pitx1 a aussi été détecté dans ce premier arc branchial (Fig I-1A).

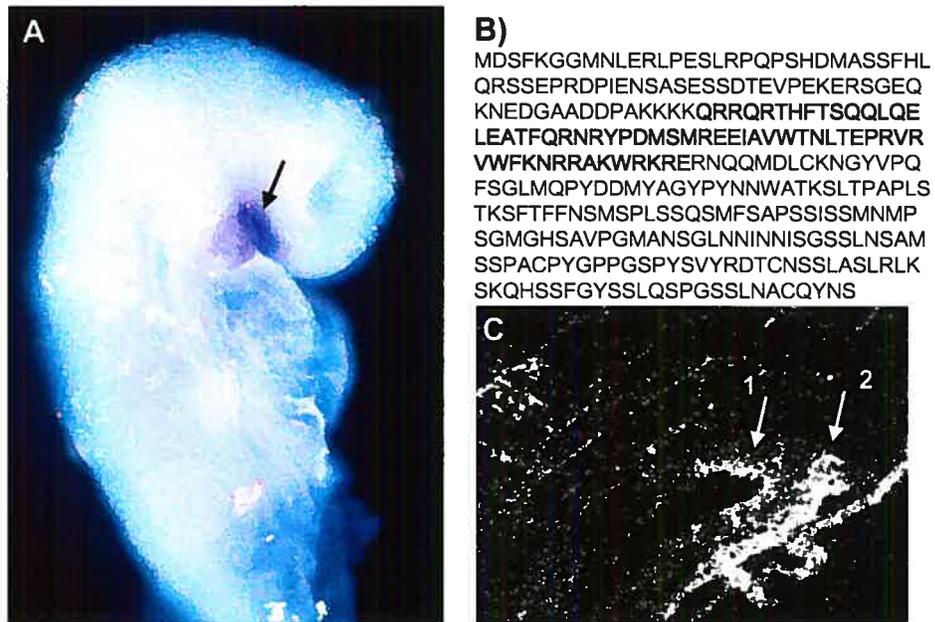


Figure I-1 : Conservation de l'expression de Pitx1 chez la souris et le poulet. A) L'expression de mPitx1 est détectée dans le stomodaeum et la première arche branchiale chez la souris à e9,5. B) Séquence primaire de cPitx1. L'homéodomaine est indiqué en gras. C) Cptx1 est exprimé dans le stomodaeum (flèche 1) et dans la partie la plus antérieure du tube digestif (flèche 2) à un stade de 10 somites.

Pour caractériser l'expression de Pitx1 chez le poulet, nous avons premièrement cloné cPitx1 à partir d'une banque d'ADNc d'hypophyse de poulet (Fig I-1B). cPitx1 est identique à 84% avec son orthologue de poulet et les homéodomaines sont conservés à 100%. J'ai détecté l'expression de cPitx1 dans le stomodeum d'embryon de poulet au stade de développement à 10 somites (Fig I-1C). À ce stade la poche de Rathke n'est pas encore formée. On détecte aussi l'expression dans le tube digestif antérieur comme c'est le cas aussi chez la souris (Lanctôt et al., 1997).

L'expression de Pitx1 dans le stomodeum est conservée chez la souris et le poulet. Qui plus est, j'ai détecté l'expression de cPitx1 dans l'épithélium oral avant la formation de la poche de Rathke. Ces résultats sont consistants avec l'hypothèse que Pitx1 a un rôle à jouer dans le développement de l'hypophyse en général.

I.3 Matériel et méthodes

I.3.1 Hybridation *whole mount*

Les embryons de souris ont été disséqués au jour e9.5 et fixés dans la paraformaldéhyde 4%. Une sonde d'ARN contenant l'homéodomaine, la région C-codante et 268 pb de région 3' non-traduite a été synthétisée et marquée à la digoxygénine. Les étapes de traitement de perméabilisation à la protéinase K,

hybridation, lavages, incubation avec l'anticorps anti-DIG, lavage et révélation au BCIP/NBT sont décrites dans Henrique et al (1995).

I.3.2 Clonage de cPitx1

Nous avons utilisé un fragment de 1510 nucléotides de l'ADNc de mPitx1 pour cribler une banque d'ADNc d'hypophyse de poulet offerte par Nicci Illing (University of CapeTown). J'ai lavé les membranes à faible stringence (1x SSC/0,1% SDS 55°C). Les plaques ont été purifiées selon les méthodes habituelles (Lamonerie et al., 1996). J'ai obtenu cinq clones se chevauchant et je les ai séquencés.

I.3.2 Hybridation *in situ*

Les embryons de poulets ont été disséqués après une incubation de 48h à 37°C dans un environnement humide, fixés dans la paraformaldéhyde 4% et enrobés dans la paraffine. Une sonde d'ARN contenant une partie de la région C-codante et toute la région 3' non-traduite a été synthétisée et marquée au ³⁵S. Cette sonde a subi une hydrolyse alcaline pour ramener sa taille moyenne à environ 500pb. Les étapes d'hybridation, lavages, émulsion et révélation ont été adaptées de Wilkinson (1992) et décrites dans Lanctôt et al. (1997). L'exposition a duré 22 jours.

Annexe II :

3 kb de régions 5' non transcrites sont insuffisantes pour activer l'expression de Tpit

II.1 Introduction

J'ai cloné le facteur de transcription à boîte T Tpit. Étant donné son rôle dans la différenciation des lignées POMC de l'hypophyse, l'analyse de l'activation de son expression dans l'hypophyse nous permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de différenciation de ces lignées. À ces fins, nous avons décidé d'isoler les régions génomiques responsables de cette activation. De plus, comme son expression est restreinte aux cellules POMC de l'hypophyse, le promoteur de Tpit constituera aussi un outil de choix pour cibler l'expression d'autres protéines dans ces cellules dans le but d'étudier les mécanismes de la différenciation ou encore la régulation de l'expression du gène de la POMC.

II.2 Résultats et discussion

II.2.1 Structure de l'ADNc de Tpit

Des expériences d'extension d'amorce ont permis d'estimer que la région 5' transcrite et non traduite du gène *Tpit* était de 335 pb (Fig II-1). En ajoutant ce résultat à ceux obtenus par *Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)* en 3', nous

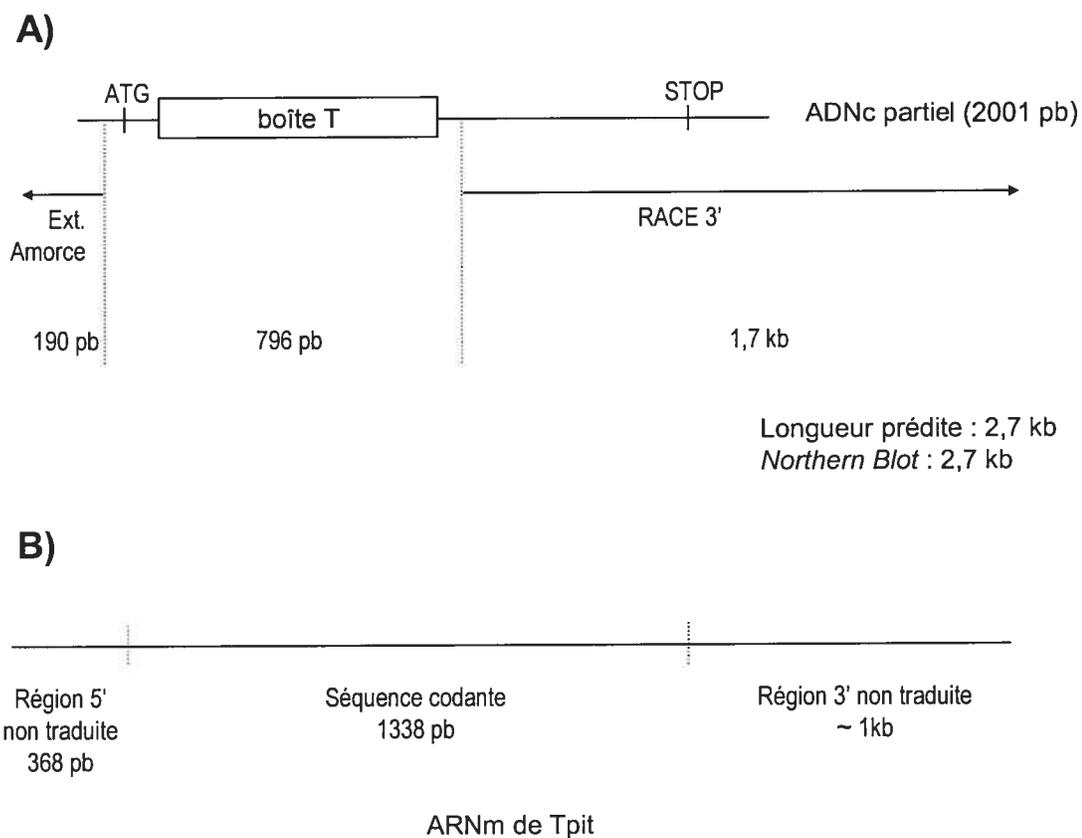


Figure II-1 : Structure de l'ADNc de *Tpit*. J'ai initialement cloné un fragment de 2001 pb de *Tpit*. Un fragment de 1,7 kb obtenu par RACE 3' (A) m'a permis d'estimer précisément la longueur de la région 3' non traduite à ~ 1kb (B). Du côté 5', j'ai déterminé à 368 pb la longueur de la région 5' non traduite par extension d'amorce.

avons pu calculé que la longueur de l'ARNm de *Tpit* est de 2,7 kb. Ceci est en accord avec la longueur indiquée par les *northern* blots.

II.2.2 Identification des régions en 5' du site de l'initiation de *Tpit*

Pour identifier les séquences génomiques du gène *Tpit*, nous avons criblé une banque λ Dash d'ADN génomique de souris SV129 par hybridation de sonde avec l'ADNc de *Tpit*. Nous avons pu isoler un phage contenant un insert de 20kb qui hybridait en Southern blot avec une amorce situé à 112 pb en aval de l'ATG dans l'ADNc mais pas avec une amorce située un peu plus en aval à 164 pb. Les fragments de restriction *Xba*I de cet insert ont été sous-clonés et celui hybridant avec l'amorce mentionnée ci-haut, d'une longueur de 10kb, a été séquencé. Le séquençage a permis d'identifier un exon contenant une séquence de type boîte TATA, GATAAAA, à 368 pb en amont de l'ATG. Ceci est compatible avec les résultats de l'extension d'amorce puisque le site prédit de l'initiation de la transcription se trouve à 29pb de cette boîte TATA. Cet exon, présumément l'exon 1, est précédé de 3 kb qui contiennent des séquences potentiellement régulatrices (Fig II-2).

La comparaison de cette séquence de 3 kb avec les régions 5' de *Tpit* chez l'humain (*hTBX19*) a montré que, parmi celle-ci, les 1,2 kb immédiatement en amont du site GATAAA ainsi que 202 bp plus en amont sont conservées à 67 % et 62% respectivement chez l'humain (Fig. II-2). Il a aussi été particulièrement intéressant de constater qu'une région de 97 pb incluant le site GATAAAA au

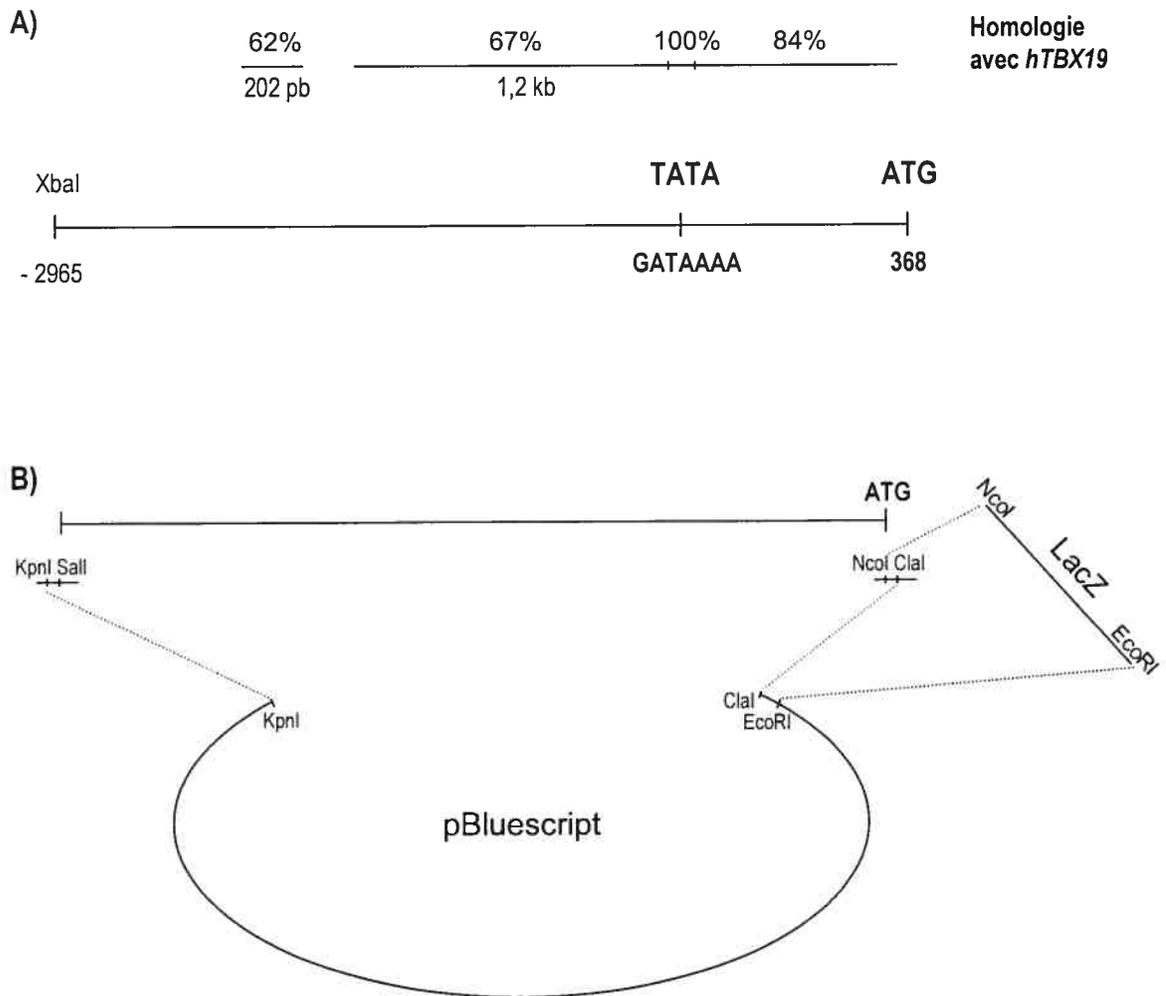


Figure II-2 : Analyse des régions 5' régulatrices de l'expression de *Tpit*. A) J'ai isolé à peu près 3 kb de région en amont de la boîte TATA. Une région de 1,2 kb immédiatement en amont de la boîte TATA est conservée à 67% avec la séquence humaine. Un autre élément de 202pb est conservé à 62%. B) Construction du transgène. Le fragment présenté en A) a été amplifié par PCR avec des amorces contenant des sites de restriction stratégiques, puis cloné dans pBluescript. De la même façon, *LacZ* a été inséré en phase avec l'ATG de *Tpit*. La construction a été vérifiée par séquençage.

milieu est conservée à 100% chez l'humain. Tout de suite en aval, les régions transcriptes non-codantes sont conservées à 84%. Ce patron d'homologie de séquence met bien en évidence la boîte TATA que j'ai identifiée plus haut à partir de la séquence et de l'extention d'amorce.

J'ai donc inséré ce fragment de 3,0 kb en amont d'un rapporteur *LacZ* de telle sorte que l'ATG de *LacZ* corresponde à celui de *Tpit*. J'ai ensuite utilisé cette construction pour générer des souris transgéniques. Une première injection a produit deux fondatrices et la deuxième trois. Nous avons croisé ces fondatrices, génotypé les rejets et il est apparu que quatre fondatrices sur cinq pouvaient transmettre le transgène à leur progéniture. Parmi les rejets transgéniques, j'en ai sacrifié au moins deux par lignée pour prélever leur hypophyse et détecter l'expression de la β -galactosidase. Malheureusement, je n'ai pu détecter cette expression dans aucune d'entre elles, pas plus que dans celles des deux fondatrices de la première injection alors que l'expression de la β -galactosidase était facilement détectable dans mes embryons témoins.

De plus, nous avons aussi testé cette construction en transfection transitoire dans des cellules AtT-20 et le niveau d'activation n'était pas plus élevé que celui du contrôle négatif. De ceci, je conclus donc que les 3kb en amont du site d'initiation de la transcription ne sont pas suffisant pour induire l'expression, qui plus est histospécifique, de *Tpit*. Toutefois, cet insert pourrait contenir des séquences importantes pour la régulation génique de *Tpit*, plus particulièrement

celles de 1,2 kb et 202 pb, qui sont conservées chez l'humain, en combinaison avec d'autres éléments de régulation.

En regard des résultats, je dois aussi considérer la possibilité qu'il y ait un autre exon dans la centaine de paires de bases ajoutées par l'extention d'amorce et que le fragment de 3 kb soit plutôt de nature intronique. Ceci apparaît à première vue improbable surtout à cause du malheureux hasard que constituerait la conservation de 1,5 kb de séquence intronique de souris chez l'humain, incluant un élément GATAAA au sein d'un élément de 100pb conservé à 100%. De plus, l'analyse transcriptionnelle bioinformatique du génome de la souris et l'augmentation du nombre de séquences dans les banques d'ADNc concernant *Tpit/Tbx19* confirment que l'ATG est bien dans l'exon 1. Il est donc vraisemblable que des éléments de régulation essentiels soient situés à l'extérieur du fragment de 3kb. C'est le cas, par exemple, du gène *Pit1* dont l'expression restreinte, elle aussi, à l'hypophyse dépend d'un *enhancer* situé à - 10,2 kb.

Pour identifier ces séquences, le gène *LacZ* pourrait être inséré dans un exon du gène *Tpit* contenu dans des BACs d'ADN de souris. La stratégie de l'inactivation génique de *Tpit* où les exons 2 et 3 ont été remplacés par *LacZ* pourrait être utilisée ici aussi. Ces constructions seraient transfectées dans des cellules AtT-20 et les BACs contenant des séquences permettant l'expression de la β -galactosidase seraient analysés.

II.3 Matériel et méthodes

II.3.1 Extention d'amorce

J'ai d'abord isolé l'ARNm de cellules AtT-20 (Qiagen). Ensuite, j'ai réalisé l'extention à l'aide d'une amorce situé à -113/-91 pb en amont de l'ATG, marqué au ^{32}P sur 100 ng d'ARNm en utilisant la transcriptase inverse *superscript* de Qiagene. Le produit de cette extention d'amorce a été analysé sur gel d'acrylamide 6%.

II.3.2 Criblage

Le criblage a été effectué par hybridation de sonde sur une banque λ Dash d'ADN génomique de souris SV129. Nous avons utilisé une sonde marquée au ^{32}P qui contenait toutes les séquences codantes de Tpit (2001pb) selon le protocole décrit dans Lanctôt et al. (1997), excepté que les membranes ont été lavées à haute stringence (1x SSC/0,1% SDS 65°C). Les plaques ont été purifiées selon les méthodes habituelles (Maniatis et al., 1989). Plusieurs phages ont été isolés et un d'entre contenait un insert de 10kb qui incluait l'exon contenant l'ATG mais pas l'exon suivant en aval. Cet insert a été sous-cloné et caractérisé.

II.3.3 Construction du transgène

Le fragment de 3 kb a été amplifié par PCR avec une amorce incluant l'ATG de *Tpit* au sein d'un site NcoI. Ceci ne modifie pas la séquence nucléotidique en amont de l'ATG. Nous avons amplifié les séquences codantes de *LacZ* et de terminaison de transcription (SV40) de manière similaire avec une amorce incluant l'ATG dans un site NcoI. Le fragment *Tpit*, puis celui de *LacZ* ont été insérés dans pBluescript (Fig II-2). La construction a été séquencée au complet.

II.3.4 Génération des souris transgéniques, génotypage, détection de la β -galactosidase

Les fondatrices ont été identifiées par hybridation *Southern* d'une sonde *LacZ* sur 10ug d'ADN génomique et les rejets par PCR dirigé sur les séquences de *LacZ*. Les hypophyses ont été prélevées et traitées comme dans Pulichino et al (2004).

Annexe III

QUELQUES CONSIDÉRATIONS ÉVOLUTIVES

En plus des rongeurs et de l'humain, Tpit a aussi été cloné chez le poulet sous le nom de Ch-TbxT (Knezevic et al., 1997). Or, Ch-TbxT est exprimé au cours de la gastrulation au niveau du sillon primitif comme Brachyury même si les patrons d'expression ne sont pas tout à fait identiques. Ceci suggère que Tpit est apparu avant le dernier ancêtre commun des oiseaux et des mammifères. Et de fait, Ruvinsky et al (2000) ont estimé que Tpit était issu d'une duplication de Brachyury avant la divergence céphalochordé/vertébrés. Knezevic et ses collaborateurs ont manqué l'expression de Tpit dans l'hypophyse de poulet puisqu'ils s'intéressaient à la gastrulation. Par contre, je n'ai pas détecté d'expression de Tpit au moment de la gastrulation chez la souris par hybridation *whole mount*. On pourrait supposer qu'originellement, la copie de Brachyury issue de la duplication était elle aussi exprimée dans le sillon primitif. L'expression de Tpit dans le sillon primitif des oiseaux serait donc un reliquat évolutif qui a été perdu chez les rongeurs. L'expression de Tpit dans l'hypophyse est donc probablement subséquente à celle de la gastrula. On pourrait se demander si le début de l'expression de Tpit dans l'hypophyse coïncide avec celui de la POMC dans la même glande au cours de l'histoire évolutive. Un programme d'anatomie comparée à l'échelle moléculaire qui pourrait mettre un peu de lumière sur la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophysaire au cours de l'évolution.