

Université de Montréal

**Du mécanisme moléculaire de la résistance hormonale à
la tumorigénèse dans la maladie de Cushing**

par

Steve Bilodeau

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

Avril, 2007

© Steve Bilodeau, 2007



QH
506
U54
2007
v.020

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 :

**Du mécanisme moléculaire de la résistance hormonale à
la tumorigénèse dans la maladie de Cushing**

présenté par :

Steve Bilodeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr François Robert, président-rapporteur

Dr Jacques Drouin, directeur de recherche

Dr Richard Roy, membre du jury

Dr Jacques Côté, examinateur externe

Dr Isabelle Bourdeau , représentante du doyen de la FES



RÉSUMÉ

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) joue un rôle essentiel pour le maintien l'homéostasie. Au cœur de cet axe, les cellules corticotropes de l'hypophyse synthétisent la proopiomelanocortine (POMC), le précurseur de l'ACTH. Les corticotropes répondent à diverses hormones telles que la CRH qui active la transcription du gène POMC et les glucocorticoïdes (Gc) qui la répriment. Les objectifs du présent travail ont été de définir le mécanisme de répression des glucocorticoïdes, de comprendre le contrôle de la croissance cellulaire dans l'hypophyse, et enfin de délimiter les processus de tumorigénèse, incluant son lien avec la réponse hormonale.

La répression du gène POMC par les Gc dépend de l'interaction entre le récepteur aux Gc (GR) et le récepteur nucléaire orphelin NGFI-B, un activateur de POMC. Au cours de ma thèse, j'ai défini les mécanismes moléculaires de cette répression et le rôle essentiel de deux protéines, Brg1 et HDAC2. La résistance aux Gc est la caractéristique principale la maladie de Cushing dans laquelle des adénomes corticotropes provoquent l'hypercortisolémie. L'expression aberrante de Brg1 et HDAC2 dans ces adénomes offre la première explication moléculaire pour leur résistance aux Gc. De plus, j'ai démontré que la présence de ces adénomes corrèle avec l'expression de cycline E et une prolifération des cellules corticotropes. Brg1 et HDAC2 répriment l'expression de cycline E et par conséquent leur expression aberrante pourrait être le lien entre la résistance hormonale et la tumorigénèse dans la maladie de Cushing.

Les régulateurs du cycle cellulaire impliqués dans la tumorigénèse corticotrope influencent aussi le développement embryonnaire. L'étude du patron d'expression de ces régulateurs a permis la découverte des étapes menant des progéniteurs aux cellules corticotropes postmitotiques. L'inhibiteur du cycle cellulaire $p57^{Kip2}$ est essentiel pour la sortie du cycle des progéniteurs hypophysaires et marque une nouvelle population de précurseurs non-prolifératifs en attente de différenciation. À l'inverse, le blocage de la différenciation terminale des lignées mélanotropes et corticotropes par

l'invalidation de Tpit, entraîne une accumulation des progéniteurs non-différenciés p57^{Kip2}-positifs. Ces résultats établissent un nouveau paradigme en démontrant le découplage entre l'arrêt du cycle cellulaire des progéniteurs et les signaux de différenciation. En résumé, la combinaison d'approches *in vivo* et *in vitro* m'a permis d'identifier plusieurs régulateurs clés de la biologie corticotrope normale et tumorale.

Mots-clés : POMC, corticotropes, glucocorticoïdes, cycle cellulaire, cycline, développement hypophysaire, différenciation, tumorigénèse.

ABSTRACT

The hypothalamo-pituitary-adrenals (HPA) axis plays an essential role in maintenance of homeostasis. At the center of this axis, pituitary corticotroph cells produce proopiomelanocortin (POMC), the ACTH precursor. Corticotrophs respond to different hormones such as CRH that activates POMC gene transcription and glucocorticoids (Gc) which repress it. Gc resistance is the main characteristic of Cushing disease that is caused by a corticotroph adenoma which leads hypercortisolism. The main objectives of this work were to understand different aspects of corticotroph biology including differentiation, hormone response and tumorigenesis.

Gc-mediated POMC gene repression is dependent on the interaction between the Gc receptor (GR) and the orphan nuclear receptor NGFI-B, a transcriptional activator of POMC. In the present work, I defined the molecular mechanisms of this repression and the essential role of two proteins, Brg1 and HDAC2. Aberrant expression of Brg1 and HDAC2 in corticotroph adenomas from human patients with Cushing disease offers the first molecular explanation for Gc resistance in this disease. Furthermore, I showed cyclin E upregulation in these adenomas and that Brg1 and HDAC activity repress cyclin E in corticotrophs. Consequently, their aberrant expression could be the link between hormone resistance and tumorigenesis in Cushing disease.

Cell cycle regulators implicated in corticotroph tumorigenesis also participate in embryonic development. Establishment of expression patterns for these regulators led to identification of previously unrecognized intermediate steps that occur prior to formation of a postmitotic corticotroph cell. Indeed, we discovered that the cell cycle inhibitor p57^{Kip2} is essential for cell cycle exit of pituitary progenitors and marks a population of non-cycling undifferentiated precursors that appear to be waiting for differentiation cues. Conversely, Tpit invalidation blocks corticotroph and melanotroph terminal differentiation and leads to accumulation of p57^{Kip2}-positive non-cycling precursors. This work defines a new paradigm by showing uncoupling of progenitor cell cycle exit from the

differentiation process. In summary, the combination of *in vivo* and *in vitro* approaches allowed identification of key regulators of normal and tumoral corticotroph biology.

Keywords: POMC, corticotrophs, glucocorticoids, cell cycle, cyclin, development, pituitary, differentiation, tumorigenesis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLES	XV
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	XVI
REMERCIEMENTS	XX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN	2
1.1. LA PHYSIOLOGIE DE L'AXE HPA.....	3
1.2. L'HYPOTHALAMUS	3
1.3. L'HYPOPHYSE.....	4
1.3.1. LE LOBE POSTÉRIEUR	4
1.3.2. LE LOBE INTERMÉDIAIRE.....	5
1.3.3. LE LOBE ANTÉRIEUR	5
1.3.3.1. Les cellules thyrotropes	6
1.3.3.2. Les cellules gonadotropes	6
1.3.3.3. Les cellules somatotropes	7
1.3.3.4. Les cellules lactotropes.....	7
1.3.3.5. Les cellules corticotropes.....	8
1.4. LES GLUCOCORTICOÏDES	8
1.4.1. LES GLANDES SURRENALES	8
1.4.2. LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES GLUCOCORTICOÏDES	9
1.4.3. LES SYNDROMES HUMAINS	11
1.4.3.1. Maladie d'Addison.....	11
1.4.3.2. Syndrome de Cushing	12
2. RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA POMC	14
2.1. LE PROMOTEUR DE POMC	14
2.1.1. LOCALISATION ET STRUCTURE	14
2.1.2. LES NOMBREUX ÉLÉMENTS DE RÉPONSE	15
2.2. LA TRANSCRIPTION HISTO-SPÉCIFIQUE DE POMC.....	16
2.2.1. PITX1 (PTX1)	16
2.2.2. NEUROD1	17
2.2.3. TPIT (TBX19)	17
2.3. LA RÉGULATION HORMONALE DE POMC	18
2.3.1. L'ACTIVATION PAR LIF	18

2.3.2.	L'ACTIVATION PAR CRH	19
2.3.2.1.	Les voies de signalisation	19
2.3.2.2.	La famille NGFI-B.....	20
2.3.2.3.	Les cofacteurs.....	22
2.3.2.4.	Tpit et les autres facteurs.....	24
2.3.3.	LA RÉPRESSION PAR LES GLUCOCORTICOÏDES	24
2.3.3.1.	Le récepteur aux glucocorticoïdes	24
2.3.3.2.	Activation, répression et trans-répression	25
2.3.3.3.	La répression de POMC	27
3.	ORGANOGENÈSE HYPOPHYSAIRE.....	29
3.1.	ORIGINE DE LA GLANDE.....	29
3.2.	LES SIGNAUX.....	30
3.2.1.	BMPs (BONE MORPHOGENIC PROTEINS)	31
3.2.2.	FGFs (FIBROBLAST GROWTH FACTORS)	32
3.2.3.	SHH (SONIC HEDGEHOG)	33
3.2.4.	NOTCH.....	34
3.2.5.	WNTs	35
3.2.6.	LES SIGNAUX ET LA TUMORIGÈNESE HYPOPHYSAIRE.....	35
3.3.	LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	36
3.3.1.	LA FAMILLE PITX	36
3.3.2.	LES FACTEURS DE TYPE LIM	37
3.3.3.	LES FACTEURS DE TYPE PAIRED	38
3.3.4.	LA FAMILLE SIX ET LES AUTRES FACTEURS	39
3.4.	LA DIFFÉRENCIATION DES LIGNÉES HYPOPHYSAIRES.....	40
3.4.1.	THYRÉOTROPES, SOMATOTROPES ET LACTOTROPES.....	40
3.4.2.	GONADOTROPES	41
3.4.3.	CORTICOTROPES ET MÉLANOTROPES	42
4.	TUMORIGÈNESE HYPOPHYSAIRE.....	45
4.1.	LE CYCLE CELLULAIRE	45
4.1.1.	LES CYCLINES ET LES CDKS.....	46
4.1.2.	LES INHIBITEURS DU CYCLE	49
4.1.2.1.	La famille Cip/Kip	49
4.1.2.2.	La famille INK4.....	53
4.2.	LES AUTRES ONCOGÈNES ET SUPPRESSEURS DE TUMEURS HYPOPHYSAIRES.....	55
4.2.1.	RB.....	56
4.2.2.	PTTG	57
5.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	58
6.	CONTRIBUTION DES AUTEURS	61
	CHAPITRE 2 : ROLE OF BRG1 AND HDAC2 IN GR TRANS-REPRESSION OF PITUITARY POMC GENE AND MIS-EXPRESSION IN CUSHING DISEASE ...	62

1. AVANT-PROPOS	63
2. SUMMARY	64
3. INTRODUCTION	65
4. RESULTS	69
4.1. BRG1 OR BRM ARE REQUIRED FOR TRANS-REPRESSION BETWEEN GR AND NGFI-B.....	69
4.2. BRG1 IS ESSENTIAL FOR GC REPRESSION OF POMC GENE TRANSCRIPTION	70
4.3. BRG1 INTERACTS WITH BOTH NGFI-B AND GR.....	71
4.4. BRG1 IS REQUIRED <i>IN VIVO</i> FOR COMPLEX FORMATION BETWEEN GR AND NGFI-B.....	72
4.5. BRG1- AND GR-DEPENDENT HDAC2 RECRUITMENT	73
4.6. TRANS-REPRESSION REDUCES HISTONE ACETYLATION AND PROMOTER CLEARANCE.....	75
4.7. MISEXPRESSION OF BRG1 OR HDAC2 IN CUSHING DISEASE	77
5. DISCUSSION.....	79
5.1. ROLE OF BRG1 IN POMC TRANSCRIPTION.....	79
5.2. BRG1, A SCAFFOLD FOR RECRUITMENT OF GR AND CO- REPRESSORS	80
5.3. THE TRANS-REPRESSION MACHINERY ACTIVELY REPRESSES TRANSCRIPTION	81
5.4. GC RESISTANCE IN CUSHING DISEASE	82
5.5. TUMORIGENIC MECHANISMS IN CUSHING DISEASE	83
6. MATERIALS AND METHODS	85
6.1. CELL CULTURE, TRANSFECTION, PLASMIDS	85
6.2. SMALL HAIRPIN RNA (SHPRNA).....	85
6.3. CO-IMMUNOPRECIPITATION ASSAYS AND WESTERN BLOTS	85
6.4. PULL-DOWN ASSAYS.....	86
6.5. CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (CHIP), Q-PCR AND NUCLEAR RUN-ON ASSAYS.....	86
6.6. IMMUNOFLUORESCENCE	87
6.7. CLINICAL SAMPLES AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY	87
7. ACKNOWLEDGEMENTS.....	98
CHAPITRE 3 : LOSS OF P57^{KIP2} UNCOUPLES PROLIFERATION FROM DIFFERENTIATION IN PITUITARY DEVELOPMENT	99

1. AVANT-PROPOS	100
2. SUMMARY	101
3. INTRODUCTION	102
4. RESULTS	105
4.1. DELAY BETWEEN CELL CYCLE EXIT AND PITUITARY DIFFERENTIATION	105
4.2. P57 ^{KIP2} AND CYCLIN E EXPRESSION MARK A NON-CYCLING UNDIFFERENTIATED CELL POPULATION.....	105
4.3. P57 ^{KIP2} PROMOTES CELL CYCLE EXIT OF PROLIFERATING PROGENITORS	107
4.4. CELL DIFFERENTIATION IS INDEPENDENT OF P57 ^{KIP2}	108
4.5. UNDIFFERENTIATED TPIT-/- CELLS ARE BLOCKED IN P57 ^{KIP2} - POSITIVE NON-CYCLING STATE	109
5. DISCUSSION	111
5.1. INDEPENDENT PROGRAMS FOR CELL CYCLE EXIT AND DIFFERENTIATION	112
5.2. STEMNESS, CELL CYCLE EXIT AND DIFFERENTIATION.....	113
6. MATERIALS AND METHODS	114
6.1. MICE AND BRDU INJECTION	114
6.2. GENERATION OF TRANSGENIC MICE.....	114
6.3. TISSUE PREPARATION AND IMMUNOFLUORESCENCE	114
7. ACKNOWLEDGEMENTS	122
 CHAPITRE 4 : CYCLIN E CONTROLS IN CORTICOTROPH CELL PROLIFERATION AND CUSHING DISEASE	 123
1. AVANT-PROPOS	124
2. SUMMARY	125
3. INTRODUCTION	126
4. RESULTS	129
4.1. POSTMITOTIC POMC CELLS GO THROUGH A MATURATION PROCESS.....	129
4.2. DIFFERENTIATED POMC CELLS PROLIFERATE IN CUSHING DISEASE.....	130
4.3. BRG1 AND HDAC ACTIVITY CONTROL CYCLIN E EXPRESSION .	130
4.4. EXPRESSION OF CYCLIN E AND LOSS OF P27 ^{KIP1} CORRELATE WITH CUSHING DISEASE	131

4.5. EXPRESSION OF CYCLIN E TRIGGERS POMC-EXPRESSING CELL PROLIFERATION.....	132
5. DISCUSSION.....	133
5.1. REACHING MATURE STAGE.....	133
5.2. CYCLIN E EXPRESSION, A STEP TOWARD TUMORIGENESIS	133
5.3. DIFFERENTIATED <i>VERSUS</i> UNDIFFERENTIATED TUMOR CELLS.....	134
6. MATERIALS AND METHODS	136
6.1. GENERATION OF TRANSGENIC MICE.....	136
6.2. TISSUE PREPARATION AND IMMUNOFLUORESCENCE	136
6.3. CELL CULTURE, SIRNA AND WESTERN BLOT	136
7. ACKNOWLEDGEMENTS.....	143
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	144
1. L'ÉTABLISSEMENT DE LA LIGNÉE CORTICOTROPE.....	144
1.1. LES PROGÉNITEURS HYPOPHYSAIRES.....	144
1.1.1. LA VOIE NOTCH.....	145
1.1.2. LES MORPHOGÈNES CLASSIQUES	145
1.1.3. LE DEGRÉ DE PLASTICITÉ	146
1.2. LA TRANSITION DE LA PROLIFÉRATION VERS LA DIFFÉRENCIATION	147
1.2.1. LA FONCTION DE P57 ^{KIP2}	147
1.2.2. LA RÉGULATION DE P57 ^{KIP2}	148
1.2.3. LA POPULATION DE PRÉCURSEURS NON-PROLIFÉRATIFS ET NON-DIFFÉRENCIÉS.....	149
1.2.4. LA FONCTION DE LA CYCLINE E	150
1.3. LA MATURATION DES CELLULES CORTICOTROPES	150
2. LA RÉPONSE HORMONALE DES CELLULES CORTICOTROPES	152
2.1. CRH ET GLUCOCORTICOÏDES.....	152
2.1.1. LES MÉCANISMES DE LA TRANS-RÉPRESSION DE POMC ..	152
2.1.2. LA FONCTION DE BRG1 ET HDAC2 DANS LE COMPLEXE TRANS-RÉPRESSEUR.....	154
2.2. UN MODÈLE GÉNÉRAL DE TRANS-RÉPRESSION.....	155
2.3. LA RÉSISTANCE HORMONALE	155
3. LA TUMORIGÉNÈSE HYPOPHYSAIRE.....	157
3.1. LA MALADIE DE CUSHING (ADÉNOMES CORTICOTROPES)	157
3.1.1. LES VOIES POTENTIELLES À L'ORIGINE DE LA TUMORIGÉNÈSE.....	157
3.1.2. BRG1 ET HDAC2, DES SUPPRESEURS DE TUMEURS ?	160

3.2.	LES AUTRES TYPES DE TUMEURS HYPOPHYSAIRES.....	161
3.2.1.	LES TUMEURS NON-DIFFÉRENCIÉES	161
3.2.2.	LES TUMEURS PLURIHORMONALES	162
4.	LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA VIE D'UNE CELLULE CORTICOTROPE : UN SCHÉMA RÉCAPITULATIF	163
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	164
	RÉFÉRENCES.....	165

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	2
Figure 1.2. Le promoteur du gène POMC et sa signalisation.....	16
Figure 1.3. Structure modulaire des récepteurs nucléaires et modes d'actions de GR.....	20
Figure 1.4. Les signaux importants lors du développement hypophysaire embryonnaire	30
Figure 1.5. Le modèle binaire de différenciation hypophysaire.....	43
Figure 1.6. Le contrôle du cycle cellulaire	46
Figure 2.1. Cell lines can/cannot support trans-repression between GR and NGFI-B.....	88
Figure 2.2. Brg1 is required for POMC promoter activity and trans- repression by GR.	89
Figure 2.3. Brg1 and Brm ATPase activity is required for repression but not for interaction with NGFI-B or GR.....	90
Figure 2.4. Brg1 is required for complex formation between NGFI-B and GR.	91
Figure 2.5. Brg1-dependent recruitment of HDAC2 to trans-repression complex.	92
Figure 2.6. POMC promoter function in repressed (Dex) and activated (CRH) conditions.....	93
Figure 2.7. Deficient Brg1 or HDAC2 expression in Cushing disease corticotroph adenomas.	94
Figure 2.8. Model of Brg1-dependent trans-repression.....	95
Figure S2.9. Assessment of protein expression in transfections experiments.....	96
Figure S2.10. Deficient Brg1 and HDAC2 expression in dog pituitary corticotroph adenomas.	97
Figure 3.1. A sub-population of non-cycling undifferentiated pituitary cells.	115
Figure 3.2. p57 ^{Kip2} and cyclin E mark non-cycling undifferentiated cells. .	116

Figure 3.3. p27^{Kip1} replaces p57^{Kip2} during pituitary differentiation.....	117
Figure 3.4. p57^{Kip2} controls precursor cell cycle exit but not differentiation.	118
Figure 3.5. Early p57^{Kip2} expression leads to pituitary hypoplasia but doesn't affect differentiation.....	119
Figure 3.6. In absence of Tpit differentiation factor, undifferentiated cells are blocked in p57^{Kip2}-positive non-cycling precursor state.....	120
Figure 3.7. Uncoupling of proliferation and differentiation during pituitary development.	121
Figure 4.1. Corticotroph cells undergo a maturation process.	137
Figure 4.2. Corticotroph cells proliferate in Cushing disease.....	138
Figure 4.3. Brg1 and HDAC activity regulates cyclin E expression.....	139
Figure 4.4. Cyclin E and p27^{Kip1} expression in Cushing disease.....	140
Figure 4.5. Cyclin E induces corticotroph proliferation but is not sufficient for corticotroph adenoma formation.	141
Figure 4.6. Maturation and tumorigenesis in corticotrophs.....	142
Figure 5.1 – Les étapes-clés de la biologie corticotrope.....	163

LISTE DES TABLES**Table I. Fonctions normales et pathologiques des glucocorticoïdes10****Table II – Fonctions hypophysaires des régulateurs du cycle cellulaire55**

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

α GSU : Sous-unité glycoprotéique α

α MSH : Hormone mélanostimuline α

β gal: β -galactosidase

A

ACTH : Adrenocortical-stimulating hormone (corticotropine)

ADN ou DNA: Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

AF-1/2 : activation function 1/2

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

ANR : Calotte ectodermique (anterior neural ridge)

AP1 : Activator Protein 1

AR : Récepteur des androgènes

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

AtT-20 : Atomic Test 20

AVP : vasopressine

B

bHLH : Hélice-boucle-hélice basique (basic helix-loop-helix)

BMP : Bone morphogenic protein

BRM : Brahma

BRG1 : Brahma-related gene 1

C

C- : Carboxy

Cdk : cyclin dependent kinase

CE : Central element

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine

COUP-TF: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor

CREB : cAMP-response element binding protein

CRH : Corticotropin releasing hormone

CUTE : Corticotroph upstream transcription element

D

DBD : DNA binding domain

DE : Distal element

Dex : Dexaméthasone

Dll : Delta-like ligand

E

e : Jour embryonnaire (embryonic day)

eGFP: Enhanced green fluorescent protein

Egr-1 : Early growth response gene-1

ER : Récepteur des oestrogènes

F

FGF : Fibroblast growth factor

FGFR : FGF receptor
FSH : Follitropine (follicule-stimulating hormone)

G

Gc : Glucocorticoïde
GH : Growth hormone (hormone de croissance)
GHRH : Growth hormone releasing hormone
GHRHr : Growth hormone releasing hormone receptor
GR : Récepteur des glucocorticoïdes
GRE : Élément de réponse à GR (GR response element)

H

HAT : histone acétyltransférase
HDAC : histone déacétylase
HIP : Hedgehog inhibitory factor
HPA (axe) : Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (hypothalamic-pituitary-adrenal)
hsp: heat shock protein

I

IAD : Déficience isolée en ACTH (isolated ACTH deficiency)
IGF : insulin-like growth hormone
IL : Interleukine
Isl: Islet 1

K

Kb : Kilobases

L

LA (ou AL) : Lobe antérieur
LBD : ligand binding domain
LH : Lutropine (luteinizing hormone)
Lhx : LIM homeobox
LI (ou IL) : Lobe intermédiaire
LIF : Leukimia inhibitory factor
LP (ou PL) : Lobe postérieur

M

MAPK : Mitogen activated protein kinase
MBP : Maltose binding protein
Mc : minéralocorticoïdes
MEF : Mouse embryonic fibroblast
MMTV : Mouse mammary tumor virus
MR : Récepteur des minéralocorticoïdes

N

N- : Amino
NBRE : NGFI-B response element
NGFI-B : Nerve Growth Factor Inducible-clone B
NCoR : Nuclear receptor Co-Repressor
nGRE : Élément de réponse négative à GR (Negative GR Response Element)
NLS : nuclear localisation signal

Nor-1 : Neuron-derived orphan receptor
 NR : Récepteur nucléaire
 nt : Nucléotide
 Nurr1 : Nur-related factor 1
 NurRE : Élément de réponse à aux facteurs Nur (Nur Response Element)

O

OT : Ocytocine

P

Pax : Paired-box
 pb : Paire de base
 PC : Prohormone convertase
 PCR : Polymerase chain reaction
 PE : Proximal element
 Pitx1/2 : Pituitary homeobox 1/2
 PKA : Protéine kinase A
 PKB : Protéine kinase B
 Pol II : ARN-polymérase II
 POMC : Proopiomélanocortine
 PP1 : Putative pituitary POMC 1
 PPAR : Proliferating peroxisome activating receptor
 PR : Récepteur de la progestérone
 PRL : Prolactine
 Prop1 : Prophet of Pit-1
 PVN : Noyau paraventriculaire

R

RAR : Récepteur à l'acide rétinoïque tout-trans
 RE : Élément de réponse (Response element)
 Rpx : Rathke's pouch homeobox
 RT : Transcriptase inverse
 RXR : Récepteur de l'acide 9cis-rétinoïque

S

SF1 : Steroidogenic factor 1
 Shh: Sonic hedgehog
 SMAD : Sma/Mothers Against Decapentaplegic
 SMRT : Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors
 SRC : Steroid receptor coactivator

T

T3 : Triiodothyronine
 T4 : Thyroxine
 Tbx: T-box factor
 TH : Thyrosine hydroxylase
 TLE : Transducin-like Enhancer of split
 Tpit/Pitx-RE : Tpit/Pitx response element
 TR : Récepteur de l'hormone thyroïdienne
 TRH : Thyrotropin releasing hormone
 TSH : Thyrotropine (thyroid-stimulating hormone)

V
VDR : récepteur de la vitamine D

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Jacques Drouin pour le support inconditionnel et les opportunités incroyables qu'il m'a offertes durant toutes ces années. Je retiendrai de nos échanges qu'il ne suffit pas d'avoir d'excellentes idées, il faut aussi connaître les bonnes personnes pour les réaliser. La rédaction des manuscrits ainsi que les autres processus administratifs aurait été un véritable calvaire sans la participation de Lise Laroche.

Ces années de thèse n'aurait certainement pas été aussi divertissantes sans la présence de plusieurs estimés collègues : Anne-Marie Pulichino, Mario Maira et Sophie Vallette ont fait en sorte que les premières années demeurent impérissables. Par la suite, la cure de rajeunissement amena une équipe jeune, dynamique et grandement appréciée. Je crois que mes projets sont maintenant entre bonnes mains et j'espère qu'Audrey Roussel, Konstantin Khetchoumian, Juliette Rambaud et Gabriella Nica sauront les mener à terme. De la part de tous, je dis merci à l'inventeur du luminomètre pour nous avoir permis de rire et/ou pleurer autant durant les réunions de laboratoire (Bonne chance Olivier, nous sommes avec toi!).

Plusieurs de mes projets ne se seraient jamais réalisés sans l'apport de personnes essentielles : Michel Robillard à la transgénése, Julie D'Amours pour le grand soin de mes souris et Annie Vallée qui, à l'inverse, les a découpées en petites tranches. Merci à mes collègues qui ont donné de leur temps pour participer aux divers comités tout au long de mes études gradués (François Robert, Jacques Côté, Luc Gaudreau, Richard Roy) incluant les corrections lors de la préparation du présent ouvrage (Konstantin, Sophie, Anne-Marie).

Finalement, je suis reconnaissant du soutien de ma famille durant toutes ces années, mais surtout à ma grande sœur Mélanie dont les anecdotes me feront toujours rire et m'ont fait réaliser à quel point le choix d'un laboratoire est une décision importante ! Bonne chance ma sœur, c'est presque terminé!

« *L'imagination est plus importante que le savoir* »

- Albert Einstein

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Depuis le début du 20^e siècle, les découvertes scientifiques se sont succédées à un rythme extrêmement rapide. La vaccination par Pasteur au milieu du 19^e siècle, la radioactivité par les Curie en 1902, les antibiotiques par Fleming en 1928, la structure en doubles hélices de l'ADN par Watson et Crick en 1953 ou plus récemment l'apparition de l'ordinateur ont révolutionné nos vies et l'ère moderne de la science. Tous les secteurs de la médecine ont tôt ou tard été influencés par les différentes découvertes scientifiques que ce soit en oncologie, en cardiovasculaire, en microbiologie clinique, en génétique humaine,... L'une des branches de la médecine qui a su profiter de ces différentes percées scientifiques et technologiques est sans aucun doute l'endocrinologie. Cette science a pris son essor à la fin du 19^e, début du 20^e siècle, suite à des observations très simples. Un excellent exemple est celui du pancréas. En 1889, Von Mering et Minkowski ont démontré que l'ablation chirurgicale du pancréas chez le chien donnait lieu à des symptômes similaires à ceux des patients humains atteints du diabète. Il a fallu toutefois attendre 1922 pour isoler le peptide responsable de la diminution de la concentration du glucose circulant, soit l'insuline. Ce n'est que trente années plus tard, en 1953, que la séquence en acides aminés de cette hormone fut déterminée par Sanger. La découverte de la structure des gènes et des récepteurs de l'insuline ont permis de mieux comprendre la régulation et le fonctionnement de la régulation hormonale. De nos jours, l'insuline est produite de façon synthétique et permet le traitement de millions de patients atteints du *diabetes mellitus* sur toute la planète. L'exemple de l'insuline s'inscrit dans une longue liste de découvertes qui ont marqué l'endocrinologie du 20^e siècle. Les hormones, des messagers permettant la communication entre deux cellules, sont à la base du maintien de l'homéostasie du corps. Qu'il s'agisse de la thyroïde, de la parathyroïde, du pancréas, des ovaires ou des testicules, des glandes surrénales, de l'hypophyse ou de

l'hypothalamus, il est question d'organes endocriniens synthétisant les hormones nécessaires au bon fonctionnement de tout le corps humain.

1. L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN

Suite à la découverte de ce moyen de communication extrêmement efficace que sont les hormones, la question fut de savoir comment le tout s'organisait en un système pour conserver l'homéostasie. Le mode d'action d'une hormone peut être très simpliste lorsqu'elle agit directement sur son organe cible ou plus complexe, en cascade, comme c'est le cas de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) (Fig. 1.1).

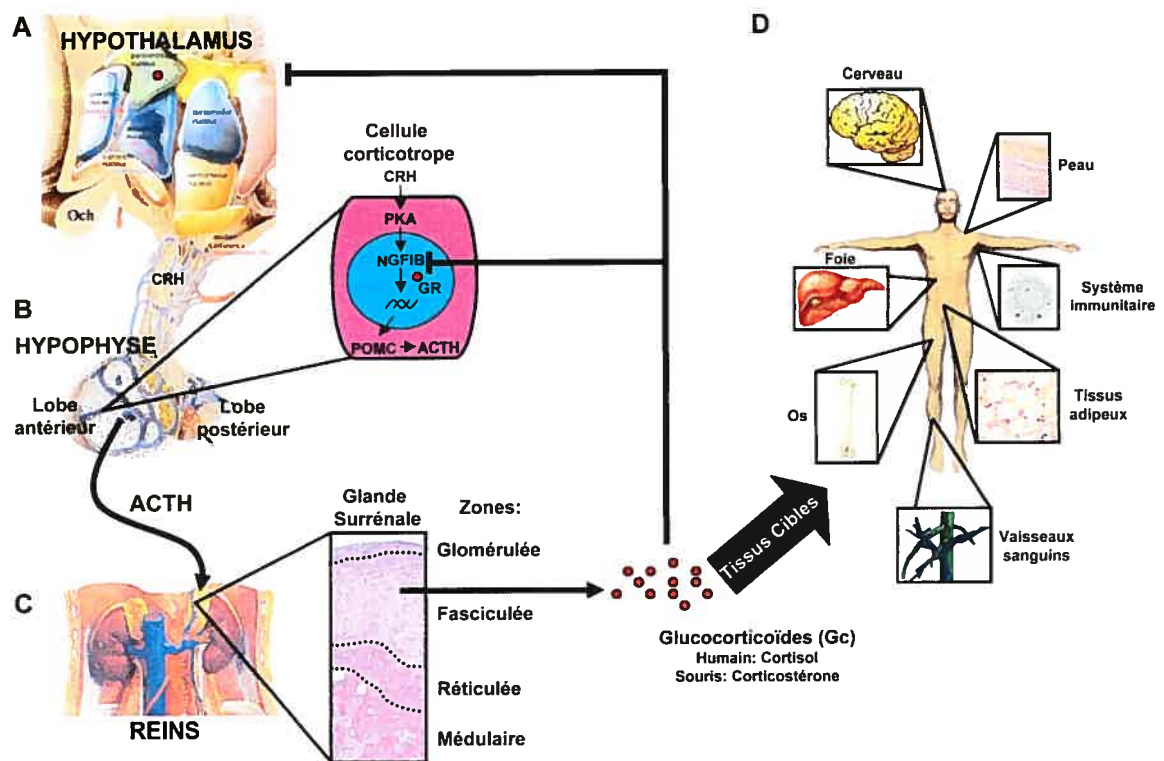


Figure 1.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (A) synthétisent le CRH qui rejoint l'hypophyse par le système porte. (B) Le CRH engage son récepteur sur les cellules corticotropes du lobe antérieur (LA) ce qui mène à une cascade de signalisation qui active la synthèse de POMC et de l'ACTH. (C) L'ACTH augmente la synthèse de glucocorticoïdes (Gc) dans les glandes surrénales. (D) Les Gc affectent par la suite une multitude de tissus en plus de rétroinhiber la synthèse et la relâche du CRH et de l'ACTH.

1.1. LA PHYSIOLOGIE DE L'AXE HPA

L'axe HPA est l'un des systèmes neuroendocriniens les plus étudiés. Il contrôle principalement la réponse au stress, mais aussi plusieurs processus biologiques tels que la digestion, le système immunitaire, l'humeur, la sexualité et l'énergie. Comme son nom l'indique, cet axe comprend trois organes : 1) l'hypothalamus, 2) l'hypophyse et 3) les glandes surrénales (Fig. 1.1).

1.2. L'HYPOTHALAMUS

L'hypothalamus se situe dans la partie ventrale du diencephale sous le thalamus du cerveau des mammifères. Il sert de lien entre le système nerveux et le système endocrinien via l'hypophyse. Il se compose de plusieurs groupes de neurones : les noyaux hypothalamique, paraventriculaire (NPV) et supraoptique (NSO) en sont des exemples. Certains des prolongements axonaux des corps cellulaires de ces neurones innervent directement la partie postérieure de l'hypophyse tandis que les autres sécrètent diverses hormones dans le système porte du lobe antérieur de l'hypophyse. Les hormones hypothalamiques sont :

- Corticotropin-releasing hormone (CRH) : peptide produit par le NPV pour stimuler la sécrétion d'ACTH et la transcription du gène codant la proopiomélanocortine (POMC) par les cellules corticotropes
- Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) : responsable de la relâche de FSH (Folliculo Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone) par les cellules gonadotropes
- Growth hormone releasing hormone (GHRH) : augmente la relâche de l'hormone de croissance (GH) par les cellules somatotropes
- Somatostatine : hormone sécrétée entre autres par l'hypothalamus qui inhibe la relâche de GH et TSH dans l'hypophyse
- Thyrotropin-releasing hormone (TRH) : elle stimule la relâche de TSH et de prolactine

1.3. L'HYPOPHYSE

L'hypophyse qui se situe sous le cerveau, dans la selle turcique, est considérée comme la glande endocrine maîtresse. Le système porte permet l'arrivée des différents facteurs régulant la physiologie de cette glande. Ce réseau sanguin lie intimement l'hypophyse avec l'hypothalamus qui sécrète les différentes hormones influentes (voir Chapitre 1, section 1.2). Pour la majorité des mammifères, l'hypophyse se subdivise en trois lobes : 1) postérieur, 2) intermédiaire et 3) antérieur.

1.3.1. LE LOBE POSTÉRIEUR

Le lobe postérieur (neurohypophyse) est connecté avec l'hypothalamus par l'infundibulum (ou tige hypophysaire). Il se compose essentiellement des terminaisons axonales des noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus ainsi que de quelques cellules gliales (pituicytes). La synthèse des hormones sécrétées par le lobe postérieur, la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT), se fait dans les corps cellulaires situés dans l'hypothalamus. Cependant, leur stockage et leur relâche s'effectuent au niveau hypophysaire ¹.

Ocytocine. L'OT joue un rôle plus important chez la femelle que chez le mâle. En effet, ses fonctions majeures sont transitoires et associées à la gestation. Par exemple, les contractions utérines qui permettent l'accouchement dans les dernières heures du travail sont sous contrôle de l'OT ². D'autre part, l'OT contrôle la relâche du lait lors de la lactation. L'inactivation du gène codant pour l'OT chez la souris rend les femelles incapables de nourrir leur progéniture et entraîne la mort des nourrissons, à moins que la mère soit supplémentée en OT ce qui restaure la lactation ³. De plus, l'OT pourrait jouer des rôles dans le contrôle de la prise de nourriture, la réponse sexuelle, l'instinct maternel et la contraction des muscles lisses ¹.

Vasopressine. Le rôle physiologique majeur de l'AVP est de contrôler l'osmolarité sanguine. Lorsque l'osmolarité diminue, les niveaux d'AVP diminuent ce qui mène à l'excrétion d'eau dans les urines. À l'inverse, lorsque la

concentration des électrolytes augmente dans le sang, l'AVP est sécrétée pour favoriser la rétention d'eau. Les différents changements dans la pression sanguine sont détectés par les barorécepteurs qui à leur tour modulent la sécrétion de l'AVP. De plus, au niveau hypophysaire, l'AVP contribue à la relâche de l'ACTH et la TSH.

1.3.2. LE LOBE INTERMÉDIAIRE

Le lobe intermédiaire (LI) est une structure particulière de l'hypophyse. Tout d'abord, il est présent chez la souris alors que chez l'homme, il disparaît au cours de la gestation ⁴. De plus, contrairement au lobe antérieur (LA), le LI se compose d'un seul type cellulaire : les mélanotropes ⁵. Ces cellules synthétisent et sécrètent l'alpha-melanocyte-stimulating hormone (α MSH) sous influence dopaminergique ^{6,7}. Du point de vue physiologique, la relâche de l' α MSH dans la circulation sanguine favorise la production de mélanine par les mélanocytes au niveau cutané. Ce pigment permet la coloration brune de la peau et des poils ⁵. Chez la souris, le LI est très sensible à la tumorigénèse (voir Chapitre 1, section 4) ce qui le rend attrayant pour étudier le contrôle du cycle cellulaire.

1.3.3. LE LOBE ANTÉRIEUR

L'hypophyse est souvent présentée comme la glande endocrine maîtresse, car elle sécrète plusieurs hormones. Ainsi, chacun des cinq types cellulaires du lobe antérieur de l'hypophyse exprime une hormone particulière qui contrôle l'homéostasie à divers niveaux. Un apport sanguin adéquat est nécessaire pour acheminer ces hormones vers leurs organes cibles. Les artères hypophysaires supérieures et inférieures assurent un flux sanguin constant vers la glande. Par la suite, le système porte permet une irrigation complète de la glande. Les hormones du lobe antérieur sont relâchées dans la circulation sanguine en direction de leurs tissus cibles par la veine porte efférente.

1.3.3.1. Les cellules thyroïotropes

Les cellules thyroïotropes du lobe antérieur synthétisent et sécrètent la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone). La TSH est l'une des trois hormones glycoprotéiques (avec LH et FSH, voir Chapitre 1, section 1.3.3.2). Ces hormones possèdent en commun la sous-unité alpha des hormones glycoprotéiques (α GSU), mais la sous-unité bêta diffère structurellement d'une hormone à l'autre ce qui confère sa spécificité. La TRH hypothalamique stimule la relâche de la TSH qui en retour stimule la libération des hormones thyroïdiennes : la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3). Les hormones thyroïdiennes régulent plusieurs phénomènes biologiques importants et sont donc requises pour la croissance et le développement normal en combinaison avec l'hormone de croissance (GH). L'absence des hormones thyroïdiennes mène à un retard important de l'élongation et de la maturation des os. Ces hormones contrôlent aussi le développement mammaire ainsi que celui du cerveau et sont des régulateurs majeurs de la thermogénèse du corps humain ¹. Une déficience isolée en TSH ou une augmentation de l'activité hypophysaire entraînent des déséquilibres au niveau de la glande thyroïde. Chez l'enfant, la perte de TSH entraîne l'hypothyroïdisme qui se caractérise au niveau clinique par d'importants retards de croissance et mentaux. Cette maladie est mieux connue sous le nom de crétinisme et est attribuable le plus souvent à des mutations dans le gène codant le récepteur du TRH ⁸ ou la sous-unité bêta de la TSH ^{9,10}. D'autre part, l'hypothyroïdisme diminue le métabolisme basal, la fréquence cardiaque et la résistance au froid tandis que l'hyperthyroïdisme provoque des effets opposés ¹.

1.3.3.2. Les cellules gonadotropes

La GnRH produite par l'hypothalamus cible les cellules gonadotropes de l'hypophyse. Ces cellules synthétisent les deux autres hormones glycoprotéiques, les gonadotropines LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle-Stimulating Hormone). Comme leur nom l'indique, ces hormones agissent sur les gonades, soient les ovaires et les testicules qui eux-mêmes sécrètent plusieurs

hormones stéroïdiennes régulant la croissance et le développement de plusieurs tissus ¹. Chez le mâle, la LH stimule la synthèse de la testostérone au niveau des cellules de Leydig des testicules. Chez la femelle, l'expression de LH et FSH varie en fonction du cycle menstruel. La FSH stimule la folliculogénèse et la production de progestérone par le corps jaune. De plus, la LH et la FSH stimulent la production des œstrogènes, essentielles au développement du système reproducteur femelle ¹. Une déficience en LH ou FSH hypophysaire entraîne inévitablement un hypogonadisme bloquant ainsi la maturation sexuelle. Des mutations dans les gènes codant le GnRH ou les gonadotropines entraînent également ce phénotype ¹¹⁻¹⁴.

1.3.3.3. Les cellules somatotropes

L'hormone de croissance (GH) exerce un effet important sur la croissance du corps que ce soit au niveau des os ou des muscles squelettiques. La GHRH hypothalamique stimule la production et la sécrétion de la GH au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse. La GH circulante permet la relâche des somatomédines (les IGFs, Insulin-like Growth Factors) au niveau du foie ce qui influence grandement la croissance d'une variété de tissus et d'organes. La production excessive de GH résulte en l'acromégalie. Les manifestations cliniques de cette maladie sont particulièrement évidentes au niveau des mains, des pieds et du visage car ces organes sont très sensibles aux niveaux sanguins de GH. Chez l'enfant, l'équilibre de la croissance est dépendant de GH : un excès cause le gigantisme tandis qu'un manque le nanisme. Si le déficit en GH est diagnostiqué assez tôt, la supplémentation en GH synthétique permet à l'enfant d'atteindre une taille normale ¹.

1.3.3.4. Les cellules lactotropes

Les cellules lactotropes produisent la prolactine (PRL), essentielle pour la croissance des glandes mammaires et la lactation chez la femelle. En fait, durant la gestation et la lactation, le nombre de ces cellules augmente considérablement. Les œstrogènes produits par les ovaires régulent

positivement la sécrétion de PRL tandis que la dopamine hypothalamique l'inhibe. En plus de la lactation, la PRL contrôle de concert avec LH et FSH, la biosynthèse de la progestérone, la différenciation des poils et des glandes sébacées en plus de stimuler l'expression du récepteur de LH chez le mâle. L'excès de PRL circulante entraîne l'aménorrhée, l'anovulation et la galactorrhée en plus de l'hypogonadisme ¹.

1.3.3.5. Les cellules corticotropes

Le cinquième type cellulaire, les corticotropes, fera l'objet d'une attention particulière lors du présent ouvrage. Ces cellules synthétisent la proopiomélanocortine (POMC) sous l'influence du CRH hypothalamique. Le clivage de POMC est assurée par les pro-convertases PC1 et PC2. PC1 est exprimée dans toute l'hypophyse tandis que PC2 se retrouve plus spécifiquement dans le lobe intermédiaire. PC1 permet le clivage formant l'ACTH (adrénocorticotropine) qui peut par la suite être clivée par PC2 pour former l' α MSH et la β -endorphine dans le lobe intermédiaire ¹⁵. La sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes permet la stimulation de la stéroïdogénèse dans les glandes surrénales. Chez l'Homme, le glucocorticoïde majoritaire est le cortisol tandis que chez les rongeurs c'est la corticostérone qui prédomine. Le maintien des niveaux physiologiques de Gc est d'une importance capitale pour le maintien de l'homéostasie étant donné la multitude d'organes cibles (Fig. 1.1).

1.4. LES GLUCOCORTICOÏDES

Les glucocorticoïdes (Gc) ainsi que les minéralocorticoïdes (Mc) sont des hormones stéroïdiennes synthétisées au niveau de la glande surrénale. Ces hormones agissent sur de multiples tissus pour réguler divers phénomènes. La perturbation des niveaux circulants de Gc a donc des conséquences néfastes sur l'organisme.

1.4.1. LES GLANDES SURRÉNALES

Deux tissus distincts sont à l'origine des glandes surrénales. Le cortex, qui synthétise les Gc et les Mc, dérive du mésoderme et forme la partie extérieure

de la glande. La zone médullaire dérive de la crête neurale et se trouve au centre de la glande ; c'est le lieu de synthèse des catécholamines. Le cortex des glandes surrénales se compose de trois zones histologiquement distinctes : 1) la zone glomérulée, une mince couche sur la surface extérieure, 2) la zone fasciculée, une couche centrale plus épaisse et 3) la zone réticulée, à l'intérieur, en contact avec la zone médullaire (Fig. 1.1). À l'intérieur du cortex se situent les cellules responsables de la biosynthèse des stéroïdes à partir du cholestérol accumulé dans les gouttelettes lipidiques.

La synthèse des différents stéroïdes demande la participation de plusieurs enzymes. C'est le cytochrome p450ssc qui permet la conversion du cholestérol en pregnenolone, le premier intermédiaire de synthèse. Par la suite, l'action concertée de diverses hydroxylases permet la synthèse des dérivés actifs ¹. Chez l'homme, le cortisol et l'aldostérone sont respectivement les Gc et les MCs prédominants. Les MCs sont produits principalement par la zone glomérulée, les Gc par la zone fasciculée tandis que la zone réticulée synthétise certains androgènes. Le contrôle des Gc est majoritairement hypophysaire, car la cascade CRH-POMC-ACTH stimule leur synthèse et leur sécrétion au niveau des glandes surrénales. Le déséquilibre de la concentration sanguine des Gc affecte un grand nombre de processus biologiques.

1.4.2. LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES GLUCOCORTICOÏDES

Le Gc et les Mc contrôlent des phénomènes très distincts. Le rôle majeur de l'aldostérone est de maintenir les niveaux de Na^+ dans la circulation sanguine et d'assurer une pression sanguine constante. De son côté, le cortisol supporte plusieurs fonctions cardiovasculaires, immunitaires et métaboliques en agissant sur une multitude d'organes cibles (Table I). Le potentiel anti-inflammatoire des Gc en fait la classe de médicaments la plus prescrite dans le monde en dépit de plusieurs effets secondaires.

Table I. Fonctions normales et pathologiques des glucocorticoïdes

Tissus cibles	Fonctions affectées	Hypercortisolémie (Syndrome de Cushing)	Hypocortisolémie (Maladie d'Addison)
Peau		Atrophie, augmentation de la pilosité	Augmentation de la pigmentation
Tissu adipeux	Accumulation de gras	Accumulation de gras viscéral	Perte de poids
Foie	Néoglucogenèse Liposynthèse	Augmentation de la néoglucogenèse et de la liposynthèse	Hypoglycémie
Vaisseaux sanguins		Hypertension	Hypotension
Système nerveux central	Comportement	Insomnie, anxiété, dépression	Fatigue, somnolence
Os	Ossification	Réduction de la croissance Ostéoporose	
Système immunitaire	Réponse cellulaire Réponse humorale	Suppression de la réponse immunitaire	Augmentation de l'inflammation
Pancréas	Synthèse de l'insuline	Réprime l'expression et la fonction de l'insuline (Diabète)	

Métabolisme. Les Gc affectent le métabolisme des lipides, des protéines et des carbohydrates. En effet, au niveau du foie, ils augmentent la synthèse de plusieurs enzymes de la voie de la néoglucogenèse ce qui augmente le stockage de glycogène dans les hépatocytes. Cependant, contrairement à leurs actions anaboliques sur le foie, les Gc exercent un effet catabolique sur les muscles squelettiques et les tissus adipeux. La présence des Gc bloque l'absorption du glucose par ces tissus, mais provoque la protéolyse et la lipolyse pour libérer rapidement de l'énergie. Leur présence antagonise l'action de l'insuline ce qui, en excès, mène au diabète. De plus, les Gc sont essentiels au bon fonctionnement des catécholamines et au maintien de la température du corps chez les mammifères.

Action immunosuppressive. Le potentiel anti-inflammatoire des Gc permet le traitement de maladies inflammatoires telles que l'arthrite et les dermatites. De plus, de nombreuses allergies sont également traitées par les Gc qui contrôlent divers aspects de la réponse immunitaire. D'une part, ils bloquent la réponse cellulaire en interférant avec la transcription des interleukines, la différenciation/activité des macrophages et l'infiltration des leucocytes au lieu

d'infection. D'autre part, ils agissent sur la réponse humorale en induisant l'atrophie du système lymphatique ce qui se traduit par une diminution du nombre de lymphocytes circulants. Ainsi, les anticorps essentiels pour combattre les infections ne peuvent être fournis ¹⁶.

Autres. La majorité des cellules humaines exprime le récepteur des glucocorticoïdes (GR) ce qui explique les effets pléiotropiques des Gc. Ils sont essentiels au développement normal du système nerveux, contrôlent la reproduction, l'ossification, l'accumulation et la distribution des graisses (Table I). C'est pourquoi la régulation des concentrations sanguines de Gc par l'axe HPA est d'une importance capitale pour le bon fonctionnement du corps humain.

1.4.3. LES SYNDROMES HUMAINS

Aussi bien chez l'Homme que chez la souris, les perturbations du niveau circulant des Gc entraînent des pathologies sévères, pouvant conduire à la mort. Il existe principalement deux types de désordres liés aux Gc : l'hyper et l'hypocortisolémie. L'excès de Gc circulants (hypercortisolémie) mène au Syndrome de Cushing tandis qu'une carence (hypocortisolémie) provoque la maladie d'Addison.

1.4.3.1. Maladie d'Addison

Cette maladie fut décrite pour la première fois en 1955 par Thomas Addison. Il s'agit d'une insuffisance surrénalienne due à une destruction quasi totale du cortex qui provient d'une réaction auto-immunitaire. La prévalence de cette maladie est de 40 à 60 personnes par million d'habitants. Le plus illustre patient atteint de la maladie d'Addison fut sans doute John F. Kennedy. S'il n'y a pas de supplémentation en Gc exogènes, le patient développe les symptômes associés à l'hypocortisolémie (Table I). Parmi ceux-ci, notons une augmentation de la pigmentation de la peau due à la sécrétion non-régulée d'ACTH, une perte de poids, une hypotension ainsi qu'une hypoglycémie. Une compensation par l'hydrocortisone permet de restaurer des niveaux sanguins adéquats de Gc.

1.4.3.2. Syndrome de Cushing

Le syndrome de Cushing tient son nom de Harvey Cushing qui fut au début du siècle dernier (1932), le premier à décrire les symptômes des patients ayant des niveaux circulants de Gc anormalement élevés. Les causes de l'hypercortisolémie sont multiples : 1) une tumeur hypophysaire exprimant la POMC (mieux connue sous le nom de Maladie de Cushing), 2) une tumeur ectopique exprimant la POMC, 3) une tumeur ectopique exprimant le CRH, 4) une tumeur surrénalienne surexprimant les Gc et finalement 5) une consommation abusive de Gc exogènes. Chez environ 70% des patients, le syndrome origine d'une tumeur hypophysaire exprimant la POMC à laquelle je référerai comme étant la maladie de Cushing (par opposition au syndrome). Les deux caractéristiques majeures de la maladie de Cushing sont 1) la présence d'une tumeur corticotrope ainsi que 2) une perte de la rétro-inhibition exercée par les Gc circulants sur l'expression du gène POMC. Normalement, les Gc circulants peuvent efficacement réprimer la transcription du gène POMC ; phénomène qui n'est pas observé dans ces tumeurs.

La prévalence de la maladie de Cushing est de 10 à 20 cas par million d'habitants. Les patients atteints du syndrome de Cushing manifestent une série de signes caractéristiques (Table I). Tout d'abord, les graisses se relocalisent au niveau du tronc et dans la région cervicale (Buffalo Hump). Un visage arrondi, des membres atrophiés, une faiblesse musculaire, l'apparition de poils, une augmentation de la pression sanguine ainsi qu'une intolérance au glucose sont aussi des signes de ce syndrome. Malheureusement, le traitement des patients par surrénalectomie visant à diminuer la concentration sanguine de Gc risque d'entraîner le Syndrome de Nelson dû au maintien et au développement de la tumeur hypophysaire. Par conséquent, le seul traitement efficace est l'ablation chirurgicale de la tumeur hypophysaire, mais les risques de récives sont élevés

17.

Dans les chapitres suivants, je m'intéresserai particulièrement à la Maladie de Cushing (adénome corticotrope hypophysaire). Je traiterai de la résistance

hormonale (voir Chapitre 2) ainsi que de la tumorigénèse (voir Chapitre 4) des cellules corticotropes. À ce jour, il n'existe aucune explication moléculaire ou modèle de souris de cette maladie.

2. RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA POMC

La régulation de la transcription est très complexe, car l'ADN se compose de séquences activatrices autant que répressives. Généralement, ces régions régulatrices se concentrent en amont d'un gène et constituent le promoteur. Sur cette séquence promotrice, une multitude de facteurs de transcription se lient et modulent l'activité transcriptionnelle du gène. Le recrutement de différents coactivateurs ou corépresseurs sur ces régulateurs transcriptionnels influence l'activité de l'ARN polymérase II responsable de la synthèse de l'ARNm. De plus, le microenvironnement chromatinien dans lequel s'inscrit ce locus influe sur la cinétique d'expression. Par conséquent, le recrutement d'acétylases, déacétylases, méthylases et kinases des histones fait aussi partie intégrante de la régulation transcriptionnelle. Le point clé de la régulation de l'axe HPA est le contrôle de l'expression du gène de la POMC et c'est pourquoi la fine régulation de ce promoteur a été et est toujours étudiée.

2.1. LE PROMOTEUR DE POMC

Depuis plusieurs années, le promoteur du gène POMC fait l'objet d'intenses investigations qui ont permis d'identifier et de caractériser divers éléments de réponses, ainsi que les facteurs de transcription qui les régulent et les voies de signalisation qui l'influencent (Fig. 1.2).

2.1.1. LOCALISATION ET STRUCTURE

Les premiers travaux effectués chez l'homme ont permis de démontrer que la séquence régulatrice du gène POMC se trouve en position 5' du premier exon du gène¹⁸. Une séquence d'ADN de 769 nucléotides (-706/+63) est capable de récapituler parfaitement l'expression de POMC *in vivo*¹⁹. L'utilisation de constructions du promoteur arborant des délétions successives a permis d'établir la séquence minimale requise pour la spécificité du promoteur dans les cellules corticotropes AtT-20. Cette séquence se situe entre les nucléotides -480 et +63²⁰. Le promoteur de POMC se subdivise en trois domaines fonctionnels²⁰⁻²² (Fig. 1.2):

- Le proximal (PE) : Ce domaine est adjacent au promoteur minimal (-34 à +63) et regroupe les nucléotides -166 à -134. Il confère une activité faible et non spécifique à la lignée corticotrope.
- Le central (CE) : Ce domaine s'étend de la position -323 à -166 et comprend le cœur du promoteur. En combinaison avec la portion distale, il confère l'essentiel de l'activité.
- Le distal (DE) : Le DE contient les nucléotides -480 à -323. Individuellement, le DE ne possède qu'une faible activité transcriptionnelle, mais en présence du CE, les deux synergisent.

In vivo, les séquences régulatrices comprises entre -480 et +63 sont suffisantes pour diriger l'expression dans les cellules mélanotropes et corticotropes ²³. Par contre, au niveau hypothalamique, ce sont des séquences situées entre -13 et -9kb qui sont nécessaires pour l'expression du gène POMC ^{24,25}. Toutefois, ce sont les 500 premiers nucléotides qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études.

2.1.2. LES NOMBREUX ÉLÉMENTS DE RÉPONSE

Les expériences d'empreintes à la nucléase (footprinting) ont identifié plusieurs régions du promoteur liant potentiellement des facteurs de transcription. Des études de retard sur gel et de mutagénèse ont confirmé l'existence de ces complexes régulateurs en plus de valider l'importance de ces sites pour l'expression de POMC. Au cours des quinze dernières années, plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés comme des régulateurs transcriptionnels du gène POMC ; certains d'entre eux sont des facteurs ubiquitaires tandis que d'autres montrent des patrons d'expression très spécifiques.

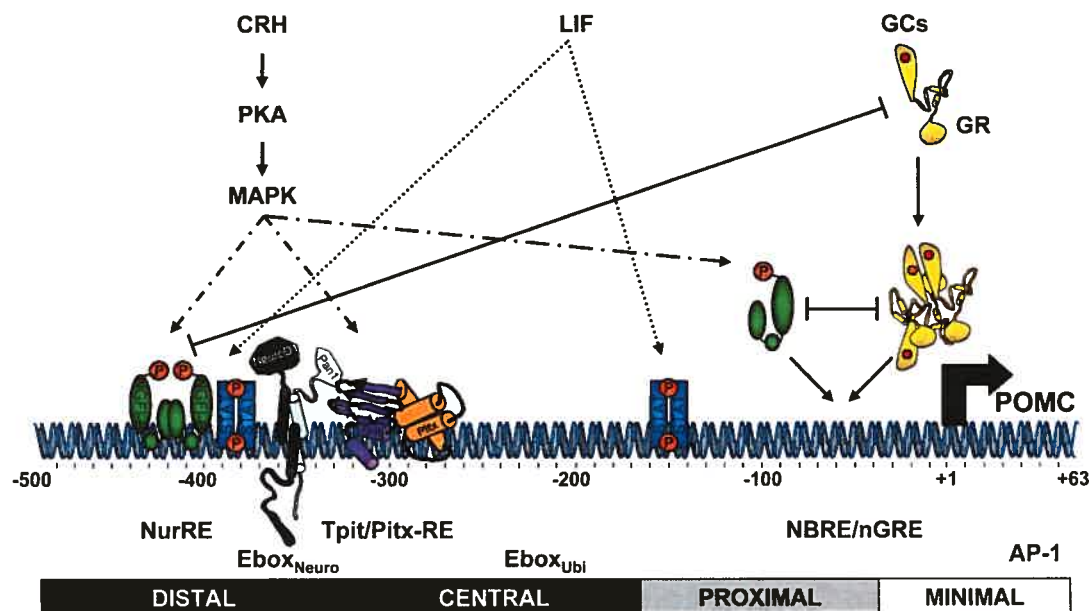


Figure 1.2. Le promoteur du gène POMC et sa signalisation

Le promoteur de POMC se compose d'environ 500 nucléotides et se divise en trois régions : proximale, centrale et distale. La transcription de POMC est contrôlée par plusieurs voies de signalisation qui activent différents facteurs de transcription. La réponse au CRH est dépendante de la protéine kinase A (PKA) et les MAPK pour l'activation de NGFI-B et Tpit. Le LIF (Leukemia inhibitory factor) active la transcription en augmentant le recrutement de STAT3 au promoteur. Les Gc lient leur récepteur (GR) au niveau cytoplasmique et GR transloque au noyau pour réprimer l'expression de POMC soit en liant NGFI-B au NurRE ou en se liant directement sur le nGRE.

2.2. LA TRANSCRIPTION HISTO-SPÉCIFIQUE DE POMC

Plusieurs facteurs semblent contribuer à l'activité de base du promoteur. Parmi ceux-ci, notons l'influence présumée des facteurs ubiquitaires COUP-TF²², SP1^{26,27}, PO-B²⁸ et Brn3a²⁹ sur l'activité de base du promoteur. Cependant, ces facteurs ne peuvent pas expliquer le fait que le promoteur de POMC ne soit actif que dans les lignées corticotropes et mélanotropes. Pour ce faire, d'autres facteurs ou cofacteurs spécifiques de ces lignées doivent intervenir.

2.2.1. PITX1 (PTX1)

La région CE3 du promoteur comprise entre les nucléotides -322 et -287 contient une région régulatrice importante puisque sa délétion entraîne une perte

d'activité d'environ 85% du promoteur ³⁰. Le criblage d'une banque d'ADNc provenant du modèle cellulaire AtT-20 a permis d'identifier le facteur de transcription Pitx1. Ce facteur de transcription à homéodomaine de la sous-famille bicoïde est exprimé durant le développement hypophysaire (voir Chapitre 1, section 3.3.2. pour son rôle développemental). Pitx1 est capable de lier efficacement son élément de réponse et d'activer la transcription de POMC ³⁰. De plus, le CE3 est suffisant pour la synergie avec la partie distale du promoteur.

2.2.2. NEUROD1

Dans la partie distale du promoteur, un élément essentiel à la transcription histo-spécifique de POMC a également été identifié. En effet, la partie DE2 du promoteur contient une boîte E conférant une activité dépendante des facteurs bHLHs nommée CUTE (corticotroph upstream transcription element-binding) ²¹. Par la suite, Poulin *et al.* ont démontré que ce facteur est en fait NeuroD1 (BETA2), un facteur de transcription membre de la famille des bHLHs ³¹. Au niveau du pancréas, il joue un rôle critique dans la production de l'insuline ³². Puisque NeuroD1 fait parti de la classe B des bHLHs, il doit nécessairement hétérodimériser avec un facteur de classe A, Pan1/E47 pour lier l'ADN et activer la séquence DE2C ³¹. De plus, le DE2C et le CE3 coopèrent de façon étroite ce qui est reflété par la synergie transcriptionnelle entre Pitx1, NeuroD1 et Pan1 ³¹. Cette synergie est dépendante de l'interaction directe entre Pitx1 et Pan1 ³³.

2.2.3. TPIT (TBX19)

Pitx1 et NeuroD1 sont exprimés dans plusieurs tissus et ils ne peuvent pas assurer l'expression histo-spécifique du gène POMC. L'analyse minutieuse de l'élément CE3 a révélé la présence d'un site contigu au site requis pour la liaison de Pitx1 dont la mutation abolit l'activité transcriptionnelle du promoteur. Cette séquence, TCACACC, est pratiquement identique au demi-site T liant le facteur à boîte T Brachury ³⁴. En utilisant une stratégie par PCR avec des oligonucléotides dégénérés, Lamolet *et al.* ont cloné un nouveau facteur à boîte T, Tpit (Tbx19) ³⁵. Au niveau développemental, l'expression de Tpit précède de

quelques heures celle de la POMC et n'est détectée dans aucune autre lignée hypophysaire (voir Chapitre 1, section 3.4.3. pour son rôle développemental). La proximité de l'élément de réponse de Tpit avec celui de Pitx1 suggère que les deux facteurs peuvent coopérer au niveau transcriptionnel. En effet, Tpit et Pitx1 activent la transcription de POMC en synergie³⁵. En plus de son interaction avec Pitx1, Tpit peut interagir avec Pan1 et former un hétérodimère capable d'activer la transcription de POMC³⁶. *In vivo*, contrairement à Pitx1 ou NeuroD1, l'expression ectopique de Tpit à l'aide du promoteur de l' α GSU dans la partie rostrale de l'hypophyse mène à l'expression de POMC. Ce résultat démontre que ce facteur est suffisant pour l'expression de POMC³⁵. L'ensemble de ces facteurs de transcription forme le premier niveau de régulation transcriptionnelle de POMC : ils lient directement l'ADN et contribuent à l'activité constitutive du promoteur dans les cellules corticotropes.

2.3. LA RÉGULATION HORMONALE DE POMC

Avec son rôle central dans le contrôle de l'axe HPA, le promoteur de POMC se doit d'intégrer les différents signaux présents dans l'environnement de la cellule corticotrope. Plusieurs cytokines et hormones modulent l'expression de POMC positivement ou négativement.

2.3.1. L'ACTIVATION PAR LIF

Le facteur LIF (Leukemia Inhibitory Factor), une cytokine à effets pléiotropiques, joue un rôle important dans la réponse immunitaire systémique, mais aussi dans le contrôle l'axe HPA. En effet, le LIF engage son récepteur (LIFR), au niveau membranaire et active la synthèse et la sécrétion de POMC^{37,38}. Cette activité est dépendante des facteurs de la famille STAT³⁸. *In vivo*, la délétion du gène LIF ainsi que celle de son récepteur mènent à une diminution de la concentration de l'ACTH dans la circulation sanguine démontrant la pertinence *in vivo* de cette voie de régulation^{39,40}. La séquence d'ADN -399/-379 du promoteur de POMC semble être le médiateur principal de cette réponse. En effet, ce site sert pour la liaison directe de STAT3 au promoteur⁴¹. Cependant, une autre étude démontre que ce site n'est pas unique puisque sa délétion n'entraîne pas l'abolition

complète de la réponse au LIF ce qui suggère différents mécanismes d'activation⁴².

2.3.2. L'ACTIVATION PAR CRH

L'un des régulateurs majeurs du fonctionnement hypophysaire normal est l'hypothalamus. Il influence grandement la physiologie de l'hypophyse en sécrétant divers peptides dans le système porte (voir Chapitre 1, section 1.2). De ce nombre, les cellules du noyau paraventriculaire produisent le CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) qui est véhiculé par le système porte. Cette hormone de 41 acides aminés est responsable de la sécrétion d'ACTH et de l'augmentation de synthèse de la POMC.

2.3.2.1. Les voies de signalisation

Il existe deux récepteurs différents pour la liaison du CRH : CRH-R1 et R2. Ils sont exprimés dans l'hypophyse et aussi dans divers endroits du cerveau. Ces récepteurs sont membres de la grande famille des récepteurs couplés à la protéine G⁴³. Suite à la liaison du CRH sur son récepteur, il s'en suit une induction rapide de la synthèse d'AMP cyclique, un second messager qui à son tour active la PKA (Protein Kinase A) et stimule la transcription de POMC^{44,45}. La PKA est une enzyme cytoplasmique capable de phosphoryler plusieurs substrats sur des résidus sérine et thréonine. De plus, elle permet de mobiliser les voies calciques et MAP (Mitogen Activated Protein) kinase. La réponse au CRH est grandement dépendante de l'entrée de calcium dans la cellule puisque l'utilisation d'un inhibiteur des canaux calciques de type L, la nifépidine, bloque cette réponse^{46,47}. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie MAPK bloque aussi la réponse induite par le CRH⁴⁸. Ainsi, l'engagement du CRH sur son récepteur mène à l'activation de plusieurs cascades de signalisation à l'intérieur de la cellule d'où les multiples effecteurs de cette réponse.

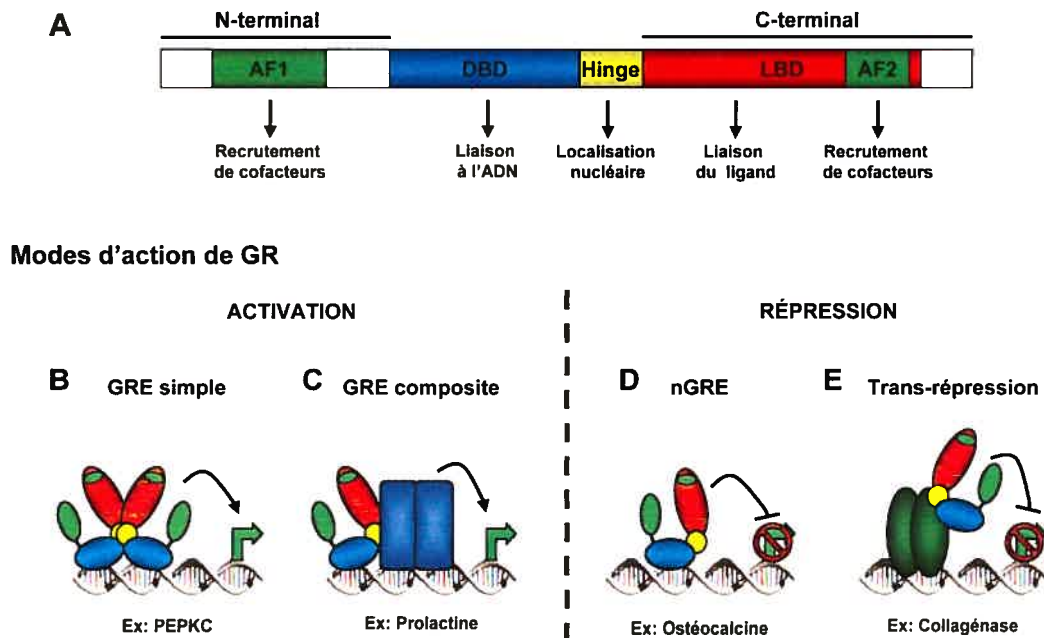


Figure 1.3. Structure modulaire des récepteurs nucléaires et modes d'actions de GR

Modes d'actions des récepteurs nucléaires. (A) Structure et organisation des différents domaines des récepteurs nucléaires. GR active la transcription en (B) formant un homodimère qui lie directement un GRE simple sur un gène cible ou (C) GR lie l'ADN en coopérant avec un facteur de transcription adjacent sur un GRE composite. La répression par GR s'effectue par (D) la liaison directe de GR sur un élément de réponse négatif (nGRE) et (E) par le mécanisme de trans-répression en interagissant directement avec un facteur de transcription sans interaction de GR avec l'ADN.

2.3.2.2. La famille NGFI-B

Au niveau nucléaire, plusieurs facteurs de transcription et cofacteurs servent de médiateurs pour les différentes voies de signalisation. Au fil des années, plusieurs éléments de réponse au niveau du promoteur de POMC ont été identifiés conférant une réponse au CRH.

Les récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires (NRs) forment une très grande famille de facteurs de transcription. Ils jouent un rôle essentiel dans le développement et le maintien de l'homéostasie du corps. La grande diversité de ces facteurs de transcription rend leurs fonctions toutes aussi variées. Chez l'humain leur nombre s'élève à 48 (49 chez la souris)⁴⁹, subdivisés en plusieurs

classes distinctes dépendamment de leurs mécanismes d'action ou bien de leurs homologies de séquences⁵⁰. Les NRs peuvent moduler la transcription de leurs gènes cibles de diverses façons : en monomère ou en dimère, avec un ligand ou non, ils activent et répriment. Cependant, les NRs partagent tous une structure modulaire commune (généralement six domaines) (Fig. 1.3) : les domaines N- et le C-terminaux sont hautement variables et renferment des fonctions de transactivation (AF-1 et AF-2), la partie centrale comprend le domaine de liaison à l'ADN avec deux doigts de zinc (DBD, DNA Binding Domain), la charnière (hinge) contient le signal de localisation nucléaire (NLS) et se termine par le domaine de liaison du ligand (LBD)^{49,51}. L'axe HPA n'échappe pas au contrôle par les NRs. En effet, aussi bien la réponse au CRH que celle aux Gc en est dépendante.

L'activation de la transcription. La famille NGFI-B (Nur) comprend trois membres : NGFI-B (Nur77), Nurr1 et Nor-1. Ces facteurs sont capables de lier directement l'ADN en monomère⁵²⁻⁵⁴ ou en hétérodimères avec eux-mêmes ou avec RXR (à l'exception de Nor-1)⁵⁵⁻⁵⁷. En monomère, ces protéines se lient à un octanucléotide AAAGGTCA qui contient la séquence canonique des NRs⁵²⁻⁵⁴. NGFI-B est reconnue comme une phosphoprotéine et un certain nombre d'évidences pointe vers un rôle de ces phosphorylations dans son potentiel activateur⁵⁸. Au niveau du DBD, la sérine 316 semble jouer un rôle crucial puisque la phosphorylation de cette sérine bloque la liaison à l'ADN de NGFI-B monomérique^{59,60}. Plusieurs kinases peuvent phosphoryler ce résidu bien précis *in vitro* et *in vivo* : PKA, PKB et pp90^{fsk} en sont toutes capables^{58,59,61-64}. De plus, NGFI-B est exporté du noyau lorsque la sérine 105 est phosphorylée par la voie MAPK⁶⁵. Par conséquent, les facteurs NGFI-B sont des effecteurs de plusieurs cascades de signalisation.

In vivo, les facteurs de la famille NGFI-B présentent des fonctions spécifiques et redondantes. La perte de NGFI-B n'entraîne que des phénotypes subtils chez la souris⁶⁶. Puisqu'il présente un patron d'expression similaire à celui de Nor-1⁶⁷, ce résultat suggère une redondance fonctionnelle entre les deux facteurs. La perte de Nor-1 génère des résultats différents dépendamment des études. La

première étude suggère un rôle seulement dans la formation de l'oreille interne et l'hippocampe ^{68,69} tandis que la seconde démontre un rôle dans le développement précoce ⁷⁰. La double invalidation génique permettra d'avancer dans la compréhension du rôle biologique de ces facteurs. De son côté, Nurr1 a un patron d'expression distinct des deux autres facteurs Nur ⁶⁷. L'ablation de ce gène entraîne la perte des neurones dopaminergiques du mésencéphale ⁷¹. Au niveau de l'axe HPA, les facteurs NGFI-B jouent un rôle dans la stéroïdogénèse en activant la transcription de StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), de P450c17 et P450c21 au niveau des glandes surrénales ⁷²⁻⁷⁵. Par conséquent, il n'est pas étonnant de leur trouver un rôle au niveau hypophysaire.

L'activation de POMC. Au niveau du promoteur de POMC, le site DE2 a été identifié comme un des principaux sites de la réponse au CRH contenant un nouveau type d'élément de réponse pour les facteurs NGFI-B ⁷⁶. Contrairement aux sites précédemment décrits permettant la liaison des facteurs Nur en monomère, le NurRE (Nur Response Element) se compose de deux demi-sites inversés espacés par six nucléotides ⁷⁶. Ce site permet la liaison d'homodimères de NGFI-B, mais aussi celle d'hétérodimères de NGFI-B/Nurr1 ⁵⁷. L'activation de PKA mène à une déphosphorylation rapide du DBD de NGFI-B ce qui augmente son affinité pour le NurRE ⁷⁷. En plus de PKA, la voie MAPK est impliquée directement dans la phosphorylation et le contrôle de l'activité de NGFI-B ⁴⁸. Ainsi, les différentes voies de signalisation convergent sur la famille des récepteurs nucléaires orphelins NGFI-B. La fonction *in vivo* des facteurs NGFI-B au niveau de la transcription de POMC ainsi que leurs patrons d'expression hypophysaires n'ont toujours pas été rapportés.

2.3.2.3. Les cofacteurs

La signalisation par le CRH influence la capacité à lier l'ADN des facteurs de la famille NGFI-B. Cependant, ces facteurs de transcription ne possèdent aucune activité enzymatique, ce qui rend leur potentiel activateur très faible. Aujourd'hui, nous savons que les facteurs de transcription fonctionnent en recrutant des

cofacteurs (coactivateurs ou corépresseurs) qui vont par la suite modifier la structure de la chromatine et/ou agir sur la machinerie transcriptionnelle de base.

Les SRCs. Les récepteurs nucléaires sont connus pour interagir avec une multitude de cofacteurs, aussi bien activateurs que répresseurs ^{51,78,79}. Parmi ceux-ci, la famille des cofacteurs SRC/p160 [SRC-1, -2 (TIF2), -3 (AIB1)], est l'une des mieux caractérisées ^{80,81}. En général, les protéines SRC interagissent avec le domaine AF-2 des NRs de façon ligand-dépendante. Toutefois, la famille NGFI-B fait exception à la règle. En effet, les trois membres de la famille SRC rehaussent l'activité transcriptionnelle de NGFI-B. Cependant, cette activation est dépendante de la région AF-1 de NGFI-B ⁷⁷. De plus, elle est spécifique de la forme dimérique et non pas monomérique de NGFI-B ⁷⁷. Suite à la stimulation par le CRH, la PKA est activée, ce qui favorise la formation d'homodimères ou d'hétérodimères de NGFI-B qui recrutent SRC2 au niveau du promoteur de POMC ⁷⁷.

La famille Rb. La famille des protéines Rb (Rétinoblastome) est très importante pour le contrôle du cycle cellulaire (voir Chapitre 1, section 4.2.1) et la différenciation de plusieurs tissus ⁸². Elle comprend trois membres Rb, p107 et p130. À l'origine perçu comme un répresseur transcriptionnel des gènes contrôlant le cycle cellulaire ⁸³⁻⁸⁵, Rb se découvre aujourd'hui des rôles d'activateur. Le premier exemple est venu de sa capacité à rehausser le potentiel activateur du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ^{86,87}. Dans les cellules tumorales AtT-20, l'expression ectopique de Rb et p107 rehausse l'expression de POMC. Cet effet sur l'activité de base du promoteur est médié par le facteur bHLH NeuroD1 ⁸⁸. De plus, Rb stimule l'activité de plusieurs récepteurs nucléaires dont ceux de la famille NGFI-B ⁸⁹. En fait, Rb rehausse l'effet des coactivateurs SRCs sur les dimères de NGFI-B. La perte d'expression de p107 par siRNA entraîne une abolition pratiquement complète de la réponse au CRH ⁸⁹. *In vivo*, la perte d'un seul allèle de Rb entraîne l'apparition de tumeurs hypophysaires ⁹⁰. Ces tumeurs sont d'origine majoritairement mélanotrope et ne sont donc pas sujettes à une régulation hormonale. À ce jour, aucune évidence d'un rôle *in vivo* de Rb dans la réponse hormonale n'a été démontrée.

2.3.2.4. Tpit et les autres facteurs

La réponse au CRH ne dépend pas uniquement du NurRE. L'analyse détaillée du promoteur de POMC a permis d'identifier plusieurs éléments conférant une réponse au CRH ^{76,91,92}. Le site AP-1 situé dans le premier exon de POMC confère une réponse faible, mais reproductible au CRH ⁹². D'autre part, l'élément CE3, reconnu pour sa capacité de lier l'hétérodimère Tpit/Pitx1 participe également à la réponse au CRH. NGFI-B et Tpit synergisent et sont tous les deux aptes à recruter SRC-2 ⁹¹. Nous pouvons donc imaginer qu'il se forme un complexe activateur contenant plusieurs facteurs au niveau du promoteur dans les minutes suivant la stimulation CRH. Toutefois, la dynamique et la preuve de l'existence et d'un tel complexe demeurent à faire.

Il existe une multitude de facteurs pouvant potentiellement stimuler la transcription de POMC. L'identification des divers complexes protéiques associés à ces différents facteurs de transcription permettra de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle de POMC. De plus, les approches de génomiques globales permettront d'inclure les modifications épigénétiques dans le schéma complet de la régulation du locus du gène POMC.

2.3.3. LA RÉPRESSION PAR LES GLUCOCORTICOÏDES

La boucle serait incomplète, si l'axe HPA ne pouvait pas être régulé négativement. Les Gc inhibent la synthèse et la sécrétion du CRH et de l'ACTH. En fait, rapidement après l'administration de Gc, la transcription du gène POMC est réprimée ⁹³. Cette étroite balance entre le CRH et les Gc permet de maintenir l'équilibre de l'axe HPA qui forme donc une boucle capable de s'autoréguler.

2.3.3.1. Le récepteur aux glucocorticoïdes

Les effets des Gc sont médiés par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR, NR3C1) de la famille des récepteurs nucléaires. GR fait parti de la famille des NR stéroïdiens. Comme tous les ligands des NRs, les Gc sont des molécules liposolubles et peuvent donc franchir la membrane et se lier à un récepteur intracellulaire. En absence de ligand, GR se localise dans le cytoplasme piégé

dans un complexe multiprotéique contenant les protéines chaperonnes hsp70 et hsp90 (heat shock protein 70 et 90). La liaison du ligand sur le LBD de GR entraîne un changement conformationnel de la protéine ce qui libère GR et permet sa translocation vers le noyau^{94,95}. Ainsi, il peut maintenant affecter la transcription de différents gènes. Fait à noter, il existe plusieurs isoformes de GR provenant d'épissage alternatifs⁹⁶. Le chapitre 2 de cette thèse se concentrera sur GR α , un isoforme dont la translocation au noyau est strictement dépendante de la présence du ligand.

2.3.3.2. Activation, répression et trans-répression

La compréhension des modes d'action des NRs a fait l'objet d'intenses études depuis les 20 dernières années. Concernant les récepteurs stéroïdiens, plusieurs modes d'action ont été décrits permettant aussi bien l'activation que la répression de la transcription⁷⁹. GR lie directement plusieurs éléments de réponse au niveau de l'ADN en plus d'interagir avec d'autres protéines et influencer leur activité⁹⁷ (Fig. 1.3).

Activation. L'activation des gènes cibles en présence du ligand est le mode d'action le plus étudié des NRs. Suite à la fixation de son ligand, GR transloque au noyau et lie la séquence consensus 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' sous forme de dimère. L'activation de la transcription est médiée par une série de cofacteurs, recrutés de façon ligand-dépendante, qui modifient les extrémités amino-terminales des histones ou remodelent la chromatine grâce à l'ATP. Tout comme NGFI-B, GR recrute les cofacteurs de la famille SRC^{94,98}, mais également d'autres protéines telles que RIP140, PELP1 et TIF1 α ^{99,100}. La protéine pRb stimule aussi l'activité transcriptionnelle de GR, en collaboration avec le complexe Swi/Snf^{86,87}. Le complexe Swi/Snf permet le remodelage la chromatine de façon ATP-dépendante et assure l'activation de la transcription par GR dans un contexte chromatinien¹⁰¹. Les gènes codants pour la tyrosine aminotransférase¹⁰², la phosphoenolpyruvate carboxykinase¹⁰³ et le gène MMTV^{104,105} sont ainsi induits par les Gc. Le Chapitre 2 de cette thèse

démontrera que Brg1, la sous-unité ATPase du complexe Swi/Snf, joue un rôle essentiel pour la trans-répression par GR sur le promoteur de POMC.

Répression. La liaison directe de GR sur l'ADN ne mène pas automatiquement à l'activation de la transcription. En fait, l'effet inverse se produit à l'occasion. La présence de ce genre de site répresseur, appelé nGRE (negative GRE), est très rare, mais nous les retrouvons sur les promoteurs de PRL, ostéocalcine et POMC ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Le site consensus pour un tel mode d'action ainsi que les cofacteurs impliqués ne sont pas encore définis. Une des possibilités serait l'interaction avec des corépresseurs du type NCoR/SMRT par exemple.

Trans-répression. La liaison à l'ADN n'est pas un phénomène nécessaire pour une manifestation au niveau transcriptionnel. La simple interaction entre les différents facteurs de transcription peut mener à une synergie transcriptionnelle aussi bien qu'à une répression. Un excellent exemple est celui de GR. En effet, il interfère avec plusieurs familles de facteurs de transcription pour bloquer leur activité transcriptionnelle : mécanisme connu sous le nom de trans-répression (sujet qui fera l'objet du Chapitre 2). Lorsque deux activateurs transcriptionnels répriment leurs activités respectives, nous avons le premier critère de la trans-répression. Pour ce faire, plusieurs mécanismes sont possibles : 1) blocage de la liaison à l'ADN, 2) compétition avec les cofacteurs sur la protéine en contact avec l'ADN ou bien 3) recrutement de corépresseurs. Les Gc représentent le plus puissant inhibiteur naturel de la réponse inflammatoire. Ils agissent ainsi en réprimant l'expression des gènes induits lors de l'inflammation. Le premier exemple de trans-répression fut la découverte d'une interaction protéique entre GR et AP-1 qui permet la répression du gène de la collagénase ¹⁰⁹⁻¹¹¹. Contrairement à l'activation de la transcription, la trans-répression par GR se fait par l'intermédiaire d'un monomère et par conséquent ne dépend pas du domaine de dimérisation ¹¹²; elle est également indépendante du DBD de GR ¹¹³. Les premières évidences suggéraient un blocage de la liaison à l'ADN de AP-1, mais les études d'empreintes à la DNase *in vivo* ont démontré que le recrutement de facteurs au site de liaison d'AP-1 n'est pas affectée par la présence de GR ¹¹⁴. L'arrivée des techniques modernes a permis de démontrer que d'autres facteurs

pouvaient être impliqués. À ce titre, le coactivateur classique SRC-2 joue un double rôle car il favorise l'inhibition exercée par GR sur l'activité AP-1^{115,116}.

Les facteurs AP-1 ne sont pas les seules cibles de GR lors de la réponse anti-inflammatoire. Le facteur NFκB est un autre exemple de facteur de transcription inhibé par GR⁹⁷. L'interférence transcriptionnelle entre ces deux facteurs a été particulièrement étudiée dans le cas du promoteur d'IL-8 (Interleukin-8) et a donné des pistes sur le mécanisme moléculaire de la trans-répression. Ainsi, GR n'interfère pas avec l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription dans ce cas, il vient plutôt entraver la phosphorylation de l'ARN polymérase II sur le résidu sérine 2 de l'extension C-terminale¹¹⁷. Le mécanisme proposé suggère que GR entre en compétition avec P-TEFb, le complexe responsable de la phosphorylation de la sérine 2¹¹⁸. Compte tenu de la diversité des facteurs, cofacteurs et promoteurs impliqués, un mécanisme universel de trans-répression n'existe peut-être pas.

2.3.3.3. La répression de POMC

Les quelques 500 nucléotides en amont du gène POMC sont suffisants pour permettre la réponse au CRH et aux Gc¹¹⁹. Tout comme la réponse au CRH, la réponse aux Gc est conférée par deux éléments distincts. En effectuant des délétions successives du promoteur de POMC, notre équipe a démontré que la partie proximale confère une sensibilité aux Gc¹²⁰. En fait, il s'agit d'un nGRE capable de recruter trois molécules de GR¹⁰⁸. Toutefois, la mutation de ce site n'entraîne pas de changement dans la réponse aux Gc dans un essai de transfection transitoire^{121,122}. L'importance *in vivo* de ce site reste donc à établir.

Il est connu depuis longtemps que les Gc répriment l'activation du gène POMC par le CRH. Après avoir trouvé le NurRE et les facteurs de la famille NGFI-B comme médiateurs importants de la réponse positive au CRH, Philips *et al.* ont démontré que GR antagonise cette réponse¹²¹. Le mécanisme proposé fut celui de la trans-répression. En fait, GR et NGFI-B se répriment mutuellement, au même titre que le couple GR/AP1. Ces premiers résultats ont conduit à l'hypothèse que l'interaction GR/NGFI-B bloquait la liaison à l'ADN de NGFI-B

sur le NurRE ¹²¹. La suite des travaux, auxquels j'ai directement participé, ont permis de démontrer que GR et les facteurs de la famille NGFI-B forment effectivement un complexe, mais de façon surprenante, ce complexe se retrouve sur l'ADN. En effet, en utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), j'ai pu démontrer qu'en présence de dexaméthasone (Dex), GR se lie au promoteur de POMC indépendamment de l'activation par le CRH ¹²². La présence d'un NurRE fonctionnel est essentielle pour la sensibilité aux Gc, puisque en son absence le promoteur maintient toujours la réponse au CRH, mais la réponse aux Gc est totalement abolie ¹²². Ainsi, la répression par les Gc du promoteur POMC est totalement dépendante sur la présence des facteurs NGFI-B ainsi que du NurRE.

Le Chapitre 2 du présent manuscrit révélera d'autres cofacteurs importants dans le complexe trans-répresseur associés à GR. La répression de la transcription du gène POMC par GR est d'une importance biologique capitale, car la perte de rétro-inhibition entraîne l'augmentation drastique de l'ACTH circulante et cause le syndrome de Cushing. La résistance aux Gc est l'une des caractéristiques majeures de la maladie de Cushing caractérisée par des tumeurs corticotropes. La découverte d'autres facteurs impliqués dans la réponse aux Gc permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de cette maladie. Nul doute que ces résultats risquent d'avoir un impact majeur dans le domaine de l'endocrinologie.

3. ORGANOGÉNÈSE HYPOPHYSAIRE

Le développement embryonnaire est une étroite balance entre la prolifération et la différenciation, car une cascade précise d'événements dirige le sort de chaque cellule. Divers signaux interviennent pour contrôler le sort cellulaire. Par exemple, la présence d'un gradient de morphogène peut permettre la prolifération, la migration et la différenciation des cellules. Les cascades de signalisation induites par ces signaux convergent sur différents régulateurs transcriptionnels qui spécifient chaque cellule. Le développement hypophysaire est un outil intéressant pour comprendre ces interrelations puisque de nombreux signaux et facteurs de transcription influencent l'organogénèse de cette glande. Une compréhension accrue des mécanismes développementaux impliqués dans la transition entre la prolifération et la différenciation aidera à identifier les événements à l'origine des tumeurs hypophysaires.

3.1. ORIGINE DE LA GLANDE

L'hypophyse dérive de la région la plus antérieure de l'axe central de l'embryon. La calotte ectodermique (anterior neural ridge, ANR) se déplace ventralement au moment où la tête de l'embryon se retourne pour former l'épithélium oral. Un épaissement de cet épithélium au jour e8.5 suite à une invagination est à l'origine de la poche de Rathke au jour e9.0 (Fig. 1.4). À l'intérieur de cette poche, les cellules prolifèrent activement pour ensuite peupler le LA de l'hypophyse. À l'opposé, le LP de l'hypophyse a une autre origine. Les terminaisons axonales qui proviennent de l'hypothalamus dérivent de l'ectoderme neural. D'un point de vue dynamique, l'ectoderme oral s'invagine car son contact avec le neuroépithélium du diencephale ventral (infundibulum), est maintenu tout au long du développement hypophysaire alors que partout ailleurs les feuillets ectodermiques et neuroectodermiques sont séparés au cours du développement cranio-facial par des dérivés du mésoderme préchordal et de la crête neurale. Le diencephale sécrète plusieurs des morphogènes essentiels à l'organogénèse et la différenciation hypophysaire (Fig. 1.4).

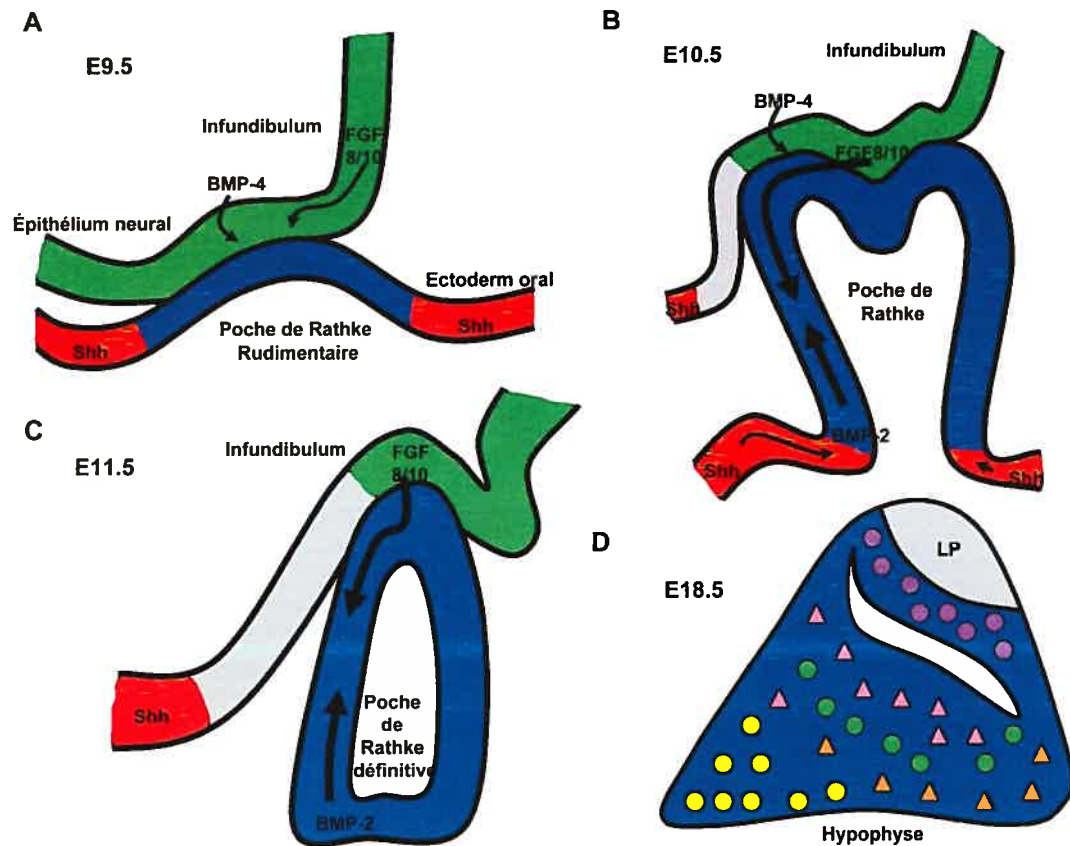


Figure 1.4. Les signaux importants lors du développement hypophysaire embryonnaire

Représentation schématique du développement hypophysaire précoce. Durant les temps développementaux e9.5 à e11.5 (A, B, C), différents morphogènes agissent sur l'organogénèse hypophysaire. (D) À e18.5, la glande contient les différentes cellules différenciées.

3.2. LES SIGNAUX

L'hypophyse représente un organe de choix pour étudier l'effet des différents morphogènes. Généralement, ces morphogènes interviennent à deux niveaux lors du développement hypophysaire : ils peuvent agir sur la prolifération ou la différenciation de la glande (Fig. 1.4).

3.2.1. BMPS (BONE MORPHOGENIC PROTEINS)

Deux membres de la famille des protéines BMP jouent des rôles importants au cours de l'organogénèse et la différenciation hypophysaire, soit BMP2 et 4. Cependant, leurs domaines d'expression ainsi que leurs cinétiques d'expression sont différents et de ce fait, leurs fonctions durant le développement hypophysaire divergent.

BMP4. BMP4 est exprimée dans le diencéphale ventral dès le jour e8.5^{123,124}. L'invalidation complète de BMP2 ou de BMP4 mène à la létalité embryonnaire à un stade précédant le développement hypophysaire complet^{125,126}. Au jour e9, les souris BMP4^{-/-} montrent une absence totale de poche de Rathke rudimentaire¹²⁷. Afin de tester la fonction biologique des BMPs, un inhibiteur spécifique, Noggin, a été exprimé sous le contrôle du promoteur de Pitx1. Dans ces souris, le développement hypophysaire s'arrête au jour e10 en se basant sur des critères morphologiques et de différenciation (à l'exception de quelques cellules corticotropes)¹²⁴. Par conséquent, la fonction de BMP4 se situe au niveau de la formation de la poche de Rathke rudimentaire.

BMP2. Contrairement à BMP4, BMP2 est exprimée au jour e10 dans le mésenchyme juxtahypophysaire ventral, à proximité des cellules exprimant α GSU de façon précoce. Par la suite, le domaine d'expression de BMP2 va s'étendre à toute l'hypophyse^{123,124}. Étant donné la mort précoce des embryons BMP2^{-/-}, sa fonction hypophysaire n'a pu être élucidée¹²⁵. Cependant, l'expression ectopique de BMPR1A, une version dominante négative du récepteur pour BMP2/4, en utilisant le promoteur de l' α GSU, mène à des souris naines. Au point de vue hypophysaire, ces souris maintiennent l'expression des marqueurs de différenciation corticotropes et gonadotropes, mais perdent les somatotropes, lactotropes et thyrotropes¹²⁴. Les résultats obtenus à partir d'explants hypophysaires montrent que le simple ajout de BMP2 est suffisant pour induire la différenciation des cellules thyrotropes tout en inhibant celle des corticotropes¹²³. L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle des BMPs dans

les précurseurs des lignées Pit1 dépendantes, les somatotropes, les lactotropes et les thyrotropes (voir Chapitre 1, section 3.4.1).

3.2.2. FGFS (FIBROBLAST GROWTH FACTORS)

Chez l'humain, les FGFs composent une grande famille de facteurs de croissance contenant 22 membres (FGF1-22) et quatre récepteurs tyrosine kinase (FGFR1-4). Ces facteurs jouent plusieurs rôles cruciaux lors du développement embryonnaire ¹²⁸.

FGF8. En plus de BMP4, l'infundibulum exprime FGF8 et FGF10 lors des phases précoces du développement hypophysaire allant du jour e9.5 jusqu'à 12.5-14.5 selon les études ^{123,124,129}. La fonction de FGF8 a été étudiée *in vivo* et *in vitro* à l'aide de différentes approches. Tout d'abord, une lignée de souris transgénique exprimant FGF8 sous le contrôle du promoteur α GSU a permis de démontrer son rôle dans la prolifération. En effet, les hypophyses de ces souris montrent des signes évidents d'hyperplasie qui se caractérisent par une augmentation du nombre de cellules corticotropes et mélanotropes et dans les phénotypes les plus extrêmes, une absence des gonadotropes, thyrotropes, lactotropes et somatotropes ¹²⁴. Malheureusement, l'inactivation de FGF8 chez la souris entraîne la mort durant la gastrulation ¹³⁰. À l'aide de culture d'explants, il a été clairement démontré que FGF8, tout comme FGF2 augmente la prolifération des précurseurs hypophysaires ¹²³.

Indirectement, l'inactivation du facteur de transcription Nkx2.1 a apporté plus d'informations sur le rôle de FGF8. L'absence de Nkx2.1 affecte le développement hypophysaire malgré le fait qu'il ne soit exprimé que dans le diencephale et aucunement dans la poche de Rathke ^{127,131}. En fait, l'inactivation de Nkx2.1 mène à la perte d'expression de FGF8 sans changement au niveau de BMP4. Dans ces souris, la poche rudimentaire est incapable d'évoluer pour former la poche définitive, probablement causé par l'incapacité à induire Lhx3 (voir Chapitre 1, section 3.3.2) ¹²⁷.

FGF10. Le patron d'expression de FGF10 est très similaire à celui de FGF8 au niveau hypophysaire ^{129,132}. Son récepteur, FGFR2, existe sous deux isoformes générées suite à des épissages alternatifs de son ARNm. Le résultat le plus intéressant provient de l'analyse des souris invalidées pour l'isoforme IIIb dont la perte bloque la réponse aux FGF1, 3, 7 et 10 ¹³³. Dans ces souris, la poche de Rathke s'atrophie car les cellules entrent en apoptose, suggérant un rôle pour un facteur autre que FGF8 ¹³³. Cependant, un rôle direct de FGF10 ne sera formellement démontré que lorsque les souris invalidées génétiquement seront analysées.

La présence des gradients de BMPs et de FGFs semble donc jouer des rôles importants durant l'organogénèse hypophysaire. Potentiellement, ils dirigent la prolifération, la spécification et la différenciation des diverses lignées. Cependant, l'effet précis de ces morphogènes au niveau cellulaire demeure un mystère.

3.2.3. SHH (SONIC HEDGEHOG)

Sonic hedgehog (Shh) fait parti d'une famille de morphogènes essentiels à l'établissement adéquat de plusieurs organes ¹³⁴. L'expression de Shh est détectée dans tout l'ectoderme oral et le diencephale à l'exception de la poche de Rathke en formation ^{124,135} (Fig 1.4). L'importance de Shh pour le développement hypophysaire ne fait aucun doute puisque les souris Shh^{-/-} ne développent pas de poche rudimentaire. La fonction biologique de Shh a été testée à l'aide d'expériences de gain et de perte de fonction dans des souris transgéniques. L'expression de l'inhibiteur de Hedgehog HIP1 (Hedgehog Interacting Protein 1) sous contrôle du promoteur hypophysaire Pitx1, génère une hypoplasie hypophysaire semblable à une hypophyse au stade développemental e9.0. De plus, nous constatons une absence totale de différenciation ¹³⁵. De plus, une expérience de gain de fonction dirigeant l'expression de Shh à l'aide du promoteur de α GSU génère une hyperplasie de la glande causée principalement par l'augmentation du nombre des cellules thyroïdiques et gonadotropes ¹³⁵. Donc, ces résultats suggèrent que la

signalisation par Shh est nécessaire pour la prolifération et la mise en place des diverses lignées. La perte de Gli2, l'un des effecteurs principaux de cette voie de signalisation, mène à des défauts développementaux au niveau hypophysaire^{136,137}. En plus de son rôle au cours du développement hypophysaire, Shh influence les cellules corticotropes en agissant sur l'expression du récepteur au CRH et conséquemment sur l'activité du promoteur POMC¹³⁸. Encore une fois, l'invalidation conditionnelle de ces gènes sera nécessaire pour décortiquer en détail le rôle de cette voie de signalisation lors du développement hypophysaire.

3.2.4. NOTCH

La voie de signalisation Notch régule plusieurs processus développementaux. Les ligands, Delta-like (Dll1, 3 et 4) et Jagged1 et 2, engagent leurs récepteurs transmembranaires, Notch (Notch1-4); il s'en suit une translocation du domaine intracellulaire du récepteur vers le noyau. Une fois dans le noyau, il forme un complexe avec le facteur de transcription Rbp-J, le principal modulateur de cette voie de signalisation¹³⁹. Au niveau hypophysaire, l'expression des gènes de la voie Notch se concentre autour de la lumière; zone où se trouvent potentiellement les précurseurs hypophysaires¹⁴⁰. Effectivement, l'expression de ces protéines se retrouve dans les potentiels précurseurs hypophysaires^{141,142}. Dans le but de tester la fonction biologique de la voie Notch, les knockouts du médiateur transcriptionnel Rbp-J ainsi que celui pour l'un des principaux gènes cibles de la voie Notch, le répresseur transcriptionnel Hes1, ont été générés et étudiés pour leurs fonctions hypophysaires¹⁴³. Aussi bien la perte de Rbp-J que celle de Hes1 mènent à une différenciation précoce des cellules corticotropes. De plus, la délétion de Rbp-J bloque complètement l'induction des lignées Pit1-dépendantes (voir Chapitre 1, section 3.4.1), ce qui suggère un rôle de la voie Notch dans le maintien et la prolifération du bassin de précurseurs de cette population. Ces résultats démontrent bien l'importance de la voie Notch au niveau hypophysaire.

3.2.5. WNTS

Les membres de la famille Wnt sont des molécules qui contrôlent la prolifération et la différenciation de plusieurs organes. Au niveau hypophysaire, Wnt4 et Wnt5a sont exprimés respectivement dans le diencephale ventral et la poche de Rathke. Tandis que les souris Wnt4^{-/-} ne montrent qu'un phénotype mineur ¹²⁴, la perte de Wnt5a résulte en une morphologie totalement aberrante de la glande, sans changement au niveau de la différenciation ¹⁴⁴. En fait, les Wnts sont en amont d'une cascade menant à l'activation de Pitx2 (voir Chapitre 1, section 3.3.1) et de cycline D2, nécessaires à la prolifération ¹⁴⁵. Cependant, la fonction précise de chacun des membres demeure à élucider. Une multitude de protéines de cette voie sont exprimées au niveau hypophysaire ¹⁴⁶, en particulier Wnt10a ¹⁴⁷, sans toutefois en connaître les fonctions.

La prochaine étape à franchir sera de déterminer précisément quelles cellules répondent à ces signaux. D'après l'hypothèse de Chen *et al.*, il existe potentiellement une cellule souche proliférative capable d'intégrer tous ces différents signaux ¹⁴¹.

3.2.6. LES SIGNAUX ET LA TUMORIGÉNÈSE HYPOPHYSAIRE

Plusieurs des signaux précédemment décrits influencent la prolifération cellulaire. Par conséquent, ils représentent des candidats de choix pour une modulation lors du processus de tumorigénèse. L'hypophyse est un organe très sensible à l'induction spontanée de tumeur (phénomène qui sera discuté en détail dans la section 4). Dans les tumeurs hypophysaires non-fonctionnelles (ne produisant pas d'hormones), nous retrouvons une augmentation des molécules de signalisation des voies Notch et Wnt, molécules pouvant potentiellement servir au maintien de la prolifération ¹⁴⁸. De plus, le facteur BMP4 semble avoir un effet inhibiteur sur les tumeurs corticotropes ¹⁴⁹. Ainsi, les évidences s'accumulent pour une fonction de ces divers signaux nécessaires au développement hypophysaire lors du processus tumoral. Une meilleure compréhension de ces signaux permettra d'identifier les interrelations entre le développement et les mécanismes à l'origine de la tumorigénèse.

3.3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Malgré l'identification de diverses voies de signalisation régulant le développement de l'hypophyse, le lien avec la transcription n'est pas si évident. Pour certaines de ces voies, les effecteurs transcriptionnels sont inconnus ou parfois seulement suggérés. Toutefois, un certain nombre de facteurs de transcription jouant un rôle lors de la prolifération et la différenciation de l'hypophyse ont déjà été décrits.

3.3.1. LA FAMILLE PITX

La famille de facteurs de transcription à homéodomaines Pitx comprend trois membres (Pitx1-3). Chacun de ces membres joue un rôle important lors du développement embryonnaire chez la souris.

Pitx1. Le premier membre de la famille caractérisé, Pitx1 (Ptx1), a été identifié comme un régulateur transcriptionnel du promoteur de POMC³⁰. Pitx1 et 2 sont exprimés au niveau hypophysaire lors du développement précoce par opposition à Pitx3 qui se concentre surtout au niveau du cerveau^{150,151}. L'étude des différentes souris mutantes pour ces gènes a révélé certaines fonctions physiologiques de ces gènes. La perte de Pitx1 n'entraîne pas de phénotype important au niveau hypophysaire si ce n'est une diminution d'expression des gonadotrophines, ce qui est en accord avec les niveaux plus élevés de Pitx1 dans les lignées cellulaires correspondantes de POMC^{152,153}. Malgré le fait qu'il ne semble pas y avoir d'effet de la perte de Pitx1 sur la différenciation, il active le promoteur de plusieurs hormones hypophysaires^{154,155}. Par ailleurs, l'expression de Pitx1 est requise pour l'identité des membres postérieurs^{152,156}.

Pitx2. Pitx2 a été identifié par clonage positionnel comme le gène responsable du syndrome de Rieger qui se caractérise par des défauts au niveau du développement des yeux, des dents et du cordon ombilical¹⁵⁷. L'inactivation de Pitx2 chez la souris a révélé plusieurs défauts développementaux sévères au niveau de l'organogénèse hypophysaire, mais aussi dans la fermeture de la cavité abdominale, du positionnement du cœur et de l'asymétrie des poumons

suggérant qu'il joue un rôle au niveau de l'asymétrie gauche-droite ¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Au niveau hypophysaire, les souris *Pitx2*^{-/-} montrent une hypoplasie qui se compare au stade embryonnaire e10.5 ^{158,159}. En fait, l'expression de certains marqueurs de différenciation dans les souris *Pitx2*^{-/-} suggère un rôle de ce facteur non seulement au niveau de la différenciation, mais aussi de la croissance de la glande. Le phénotype observé serait probablement dû à une diminution de la prolifération des précurseurs causée par une diminution de l'expression de cycline D2 ^{145,159}. Le phénotype hypophysaire est d'autant plus accentué chez les souris *Pitx1*^{-/-} *Pitx2*^{-/-}, où la poche de Rathke demeure à un stade très rudimentaire ¹⁶². Beaucoup de travail reste à faire concernant l'identification des gènes cibles de ces facteurs de transcription et leurs rôles durant le développement embryonnaire.

3.3.2. LES FACTEURS DE TYPE LIM

Plusieurs facteurs de transcription à boîte LIM sont exprimés au niveau de la poche de Rathke. Parmi ces derniers, notons la présence de *Isl1*, *Lhx3* et *Lhx4* qui jouent tous des rôles importants dans l'organogénèse hypophysaire.

Isl1. Le facteur *Isl1* s'exprime dans toute la poche de Rathke au jour e9.5, mais son expression se restreint à la partie rostrale (la plus éloignée de l'infundibulum) au fur et à mesure que le développement embryonnaire avance ¹²³. L'invalidation de *Isl1* entraîne la mort de l'embryon avant le jour e11.5 ce qui rend l'étude du phénotype hypophysaire difficile ¹⁶³. Cependant, au jour e10.5, il est connu que la poche de Rathke se forme, mais que ses parois sont très minces ¹²⁷. La régulation de *Isl1* semble être dépendante des gradients de BMPs présents dans la glande, car l'ajout de BMP2 dans un système d'explants induit son expression ¹²³. Étant donné la létalité des souris *Isl1*^{-/-}, il est pour le moment impossible de déterminer le rôle de ce facteur dans la différenciation.

Lhx3/4. Ces deux facteurs sont essentiels pour le passage du stade de poche rudimentaire au stade définitif. En effet, l'expression de *Lhx3* débute autour du jour e9 dans la poche de Rathke et sa délétion entraîne un arrêt du développement de la glande. Quelques cellules corticotropes réussissent à se

différencier, mais aucune des autres lignées hypophysaires ¹⁶⁴. Lhx4 présente un patron d'expression comparable à celui de Lhx3 suggérant une potentielle redondance. Les souris Lhx4^{-/-} ont une hypophyse hypoplasique avec une diminution du nombre de cellules différenciées ¹⁶⁵. Cependant, c'est seulement en absence de Lhx3 et Lhx4 que l'on observe un arrêt total du développement et de la différenciation hypophysaire ¹⁶⁵. Donc, ces deux facteurs semblent jouer des rôles redondants au niveau de la croissance de la glande.

3.3.3. LES FACTEURS DE TYPE PAIRED

Hesx1. Le facteur à homéodomaine de type paired, Hesx1 (Rpx), est exprimé dans la poche de Rathke et le lobe antérieur en développement jusqu'à la différenciation ¹⁶⁶. Aussi bien chez l'humain que chez la souris, une mutation dans ce gène entraîne une dysplasie hypophysaire ¹⁶⁷, mais la pénétrance du phénotype chez la souris est assez variable. Hesx1 est un répresseur transcriptionnel qui agit en recrutant le corépresseur TLE. La présence de Hesx1 permet de restreindre le domaine d'expression de FGF8/10 au niveau du diencephale et ainsi bloquer l'apparition d'hypophysés surnuméraires ¹²⁹. Cependant, la délétion de Hesx1 n'affecte pas la différenciation ce qui pointe vers un rôle unique de ce facteur au niveau de la prolifération.

Prop1. Le Prophet-of-Pit1, Prop1, est un facteur de type paired spécifique à l'hypophyse qui s'exprime tout au long du développement hypophysaire atteignant un niveau d'expression maximale vers les jours e12-13 ¹⁶⁸. Il a été identifié grâce à l'étude des souris naines Ames (ou df, dwarf) qui présentent une phénocopie des souris déficientes en Pit1 (voir Chapitre 1, section 3.4.1.), soit une forte diminution, voire une absence, des lignées lactotropes, somatotropes et thyrotropes ¹⁶⁹. Prop1 est le gène responsable de ce phénotype puisqu'il régule l'expression de Pit1, d'où son nom ¹⁶⁸. Étant donné que les souris Ames sont des mutants hypomorphes pour le gène Prop1, des souris portant une mutation nulle ont été générées. La seule différence phénotypique entre ces deux modèles est qu'il n'y a aucune différenciation des lignées Pit1-dépendantes dans les souris nulles ¹⁷⁰. En plus de son rôle crucial dans la différenciation,

Prop1 influence aussi la croissance de la glande pituitaire ¹⁷¹. En effet, les souris Ames montrent une diminution de la prolifération suivie éventuellement par l'apoptose de la glande ¹⁷². Cette diminution de la prolifération pourrait être imputable au fait que Prop1 régule l'expression de Notch2 ¹⁴⁰; or la voie de signalisation Notch est très importante pour la prolifération et la différenciation de la glande ¹⁴³. Alternativement, il se peut que la répression de Hesx1 par Prop1 soit un élément clé ^{168,173}. En effet, l'extinction de Hesx1 pourrait permettre à la cellule d'arrêter sa prolifération et de rentrer en différenciation. Chez l'humain, plusieurs mutations ont été décrites dans le gène PROP1. Comme chez la souris, la perte de ce gène chez l'humain entraîne une hypoplasie hypophysaire accompagnée d'une déficience combinée en hormones ¹⁷⁴⁻¹⁷⁸. Il semblerait donc que Prop1 joue un rôle aussi bien au niveau des précurseurs que des cellules différenciées. Par conséquent, l'identification des gènes cibles de ce facteur mènera à une meilleure compréhension des mécanismes permettant la transition d'un état prolifératif vers un état différencié.

3.3.4. LA FAMILLE SIX ET LES AUTRES FACTEURS

Une multitude d'autres facteurs jouent un rôle important lors du développement hypophysaire affectant à divers degré la prolifération et la différenciation ¹⁷⁹. De ce nombre, notons la famille Six, dont les membres 1 et 6 affectent le développement de la glande ^{180,181}. Dans les souris invalidées pour ces gènes, l'hypophyse est hypoplasique ce qui suggère un rôle pour cette famille de facteurs de transcription dans le contrôle de la prolifération.

L'intégration des diverses cascades de signalisations ainsi que leurs effecteurs mènera à une compréhension accrue de la dynamique développementale. Pour l'instant, la majorité des études se concentre sur l'identification des facteurs de transcription présents dans l'hypophyse. La première étape est de bien caractériser le patron d'expression protéique de ces facteurs en regard des marqueurs de prolifération et de différenciation. Par la suite, des approches génomiques permettront d'identifier les gènes cibles de ces divers facteurs en

plus d'élucider les réels mécanismes moléculaires de l'organogénèse hypophysaire.

3.4. LA DIFFÉRENCIATION DES LIGNÉES HYPOPHYSAIRES

Suite à l'intense phase de prolifération se situant entre les jours e10 et e14, les cellules de l'hypophyse entrent dans une phase de différenciation. Différentes lignées hypophysaires vont faire leur apparition selon une cinétique précise grâce à l'action concertée de facteurs de transcription spécifiques.

3.4.1. THYRÉOTROPES, SOMATOTROPES ET LACTOTROPES

Pit1. Pit1 (GHF-1), un facteur de transcription à domaine POU, a été isolé à l'origine pour son rôle activateur sur les promoteurs de GH et PRL^{182,183}. Par la suite, les études génétiques ont permis de découvrir que ce gène est muté dans deux modèles murins : les souris Snell et Jackson. Dans ces deux modèles de souris naines, on dénote une hypophyse hypoplasique dans laquelle les cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes sont absentes^{184,185}. Le phénotype de ces souris ressemble à celui des souris Ames, un autre modèle d'insuffisance hypophysaire¹⁶⁸. Cependant, à l'exception de l'hypoplasie, les souris Snell et Jackson montrent une structure hypophysaire normale ce qui suggère un défaut dans la différenciation terminale de ces lignées. À ce titre, le patron d'expression de Pit1 est strictement régulé. En fait, le signal Wnt, par l'intermédiaire de Prop1, permet d'activer l'expression du gène Pit1 tout en réprimant celle de Hesx1¹⁸⁶. Par la suite, dépendant du contexte cellulaire, Pit1 active ou réprime le même promoteur. Par exemple, il stimule la transcription du promoteur de la GH dans les somatotropes et la restreint dans les lactotropes¹⁸⁷. Toutefois, les mécanismes par lesquels Pit1 spécifie chacune de ces lignées ne sont toujours pas connus.

Les bHLHs. Mash1 et Math3 sont des facteurs à domaine bHLH (basic helix-loop-helix). Les souris Math3^{-/-} ne possèdent pas de cellules somatotropes tandis que les souris Mash1^{-/-} présentent des défauts dans la différenciation des lignées thyrotropes, corticotropes et gonadotropes¹⁴³. Cependant, nous ne

connaissions pas le mécanisme par lequel ces facteurs bHLH contrôlent la différenciation hypophysaire.

3.4.2. GONADOTROPES

SF1. Tout comme NGFI-B, SF1 (Stereogenic Factor 1, Nr5a1) est un récepteur nucléaire orphelin. Son expression se concentre essentiellement dans l'hypothalamus, les gonades, l'hypophyse et les glandes surrénales. Son rôle dans le système reproducteur est établi à différents niveaux ¹⁸⁸. Dans l'hypophyse, les souris déficientes en SF1 présentent une diminution de LH et FSH ^{189,190}. L'ablation conditionnelle du gène dans les cellules gonadotropes mène aussi à la perte d'expression des marqueurs terminaux de différenciation ¹⁹¹. Cependant, les cellules gonadotropes sont toujours présentes puisque la stimulation avec le GnRH permet, en absence de SF1, de reconstituer partiellement l'expression des hormones ¹⁹². Ces résultats suggèrent un rôle de SF1 dans la fonction gonadotrope et non dans la différenciation de la lignée.

GATA2. GATA2 est un facteur de transcription à doigts de zinc exprimé dans différents tissus. Au niveau hypophysaire, il est exprimé durant le développement ainsi que dans les cellules gonadotropes. Cependant, l'étude de son rôle dans le développement hypophysaire est difficile puisque les souris invalidées pour ce gène meurent tôt durant le développement embryonnaire ¹⁹³. Récemment, une invalidation conditionnelle de GATA2 dans les cellules gonadotropes a été effectuée. Ces souris montrent des niveaux plus bas de LH et FSH circulants et une diminution du nombre de cellules thyroïdiques ¹⁹⁴. Au niveau transcriptionnel, Pit1 interagit avec GATA2 pour bloquer la transcription des cibles gonadotropes ¹⁹⁵. D'autre part, ces deux facteurs peuvent travailler de concert pour activer la transcription de la TSH ¹⁹⁶. Malheureusement, le patron d'expression précis de la protéine GATA2 ainsi que sa fonction au niveau hypophysaire demeurent nébuleux.

3.4.3. CORTICOTROPES ET MÉLANOTROPES

NeuroD1 (Beta2). NeuroD1 coopère avec Ptx1 pour la transcription du gène POMC^{31,33}. Il est exprimé dans les cellules corticotropes et non pas dans les cellules mélanotropes. Son rôle *in vivo* demeure à définir si ce n'est un subtil délai dans l'apparition des cellules corticotropes³⁶.

Tpit (Tbx19). Le facteur de transcription à boîte T, Tpit, n'est pas seulement impliqué dans la transcription du gène POMC³⁵, il joue aussi un rôle crucial lors de la différenciation des cellules corticotropes¹⁹⁷. En effet, l'ablation du gène Tpit chez la souris entraîne une disparition pratiquement totale des cellules corticotropes et mélanotropes. Le résultat le plus frappant se retrouve dans le LI qui est habituellement constitué à 100% de cellules mélanotropes exprimant POMC. Dans les hypophyses Tpit^{-/-}, le LI est hypoplasique et la majorité des cellules est maintenue dans un état non-différencié. Cependant, nous retrouvons un bon nombre de cellules gonadotropes et thyrotropes. En fait, Tpit est non seulement un régulateur positif de la différenciation corticotrope, mais aussi un régulateur négatif de la différenciation gonadotrope¹⁹⁷. Toutefois, il est à noter qu'il s'agit d'un facteur de différenciation terminale puisque la morphologie de la glande n'est pas affectée. Chez l'humain, les mutations dans le gène TPIT sont associées à une maladie très rare, le déficit isolé en ACTH qui, sans traitement par des glucocorticoïdes exogènes, cause la mort en période néonatale. Ces mutations diminuent la capacité de Tpit d'activer la transcription du gène POMC^{35,198-200}. Malheureusement, ces études ne permettent pas d'établir avec certitude la cause réelle du déficit en ACTH chez ces patients. Un point demeure toujours à éclaircir à savoir s'il s'agit d'une diminution d'expression de POMC qui cause la maladie (suggéré par les essais de transfections et les retards sur gel) ou plutôt d'un défaut de différenciation menant à une absence quasi-totale des cellules corticotropes (suggéré par l'étude des souris Tpit^{-/-}). Étant donné que ces deux mécanismes mènent potentiellement aux mêmes manifestations cliniques, l'établissement d'essais de différenciation permettra de distinguer les mutations affectant la transcription de ceux interférant avec la différenciation.

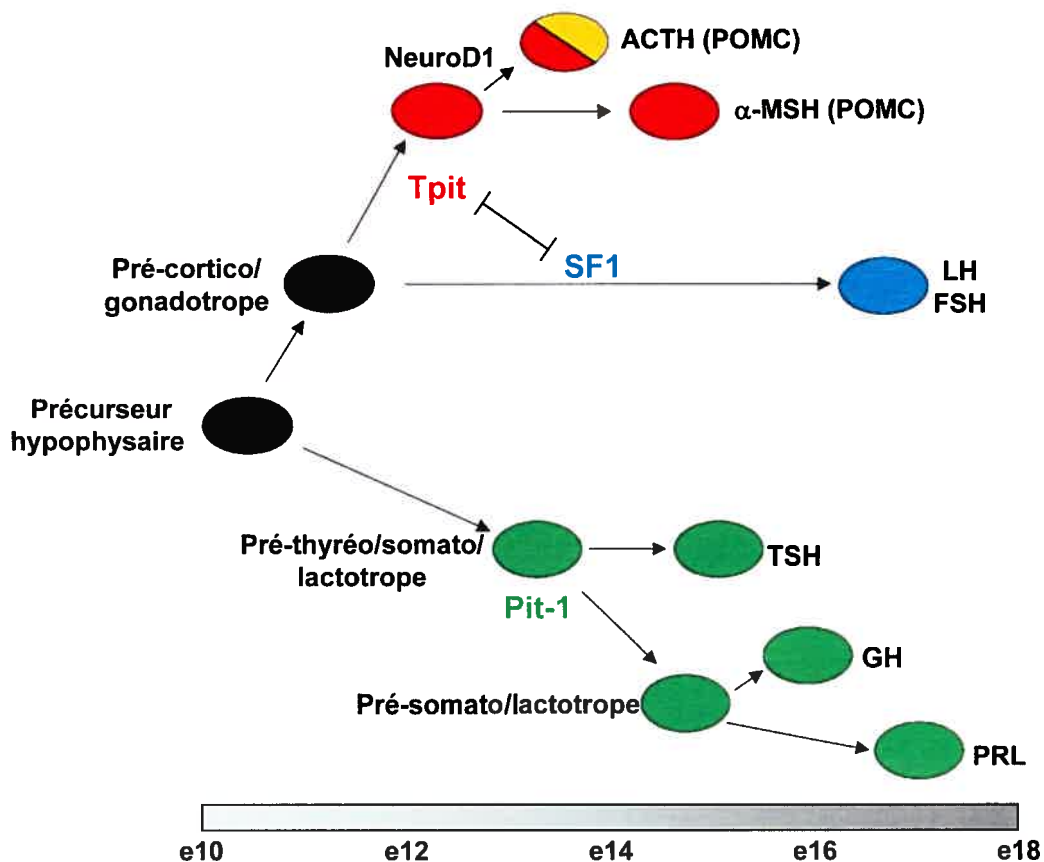


Figure 1.5. Le modèle binaire de différenciation hypophysaire

Le modèle de différenciation binaire se subdivise en deux branches. Les gonadotropes (LH, FSH), les cortico/mélanotropes (ACTH) proviennent d'une cellule commune. L'antagonisme entre Tpit et SF1 contribue au choix de cette cellule. De l'autre côté, nous retrouvons les cellules dépendantes de l'expression de Pit1 : les thyroïdotropes (TSH), les somatotropes (GH) et les lactotropes (PRL).

En résumé, le développement hypophysaire fait intervenir une multitude de signaux extracellulaires et de facteurs de transcription qui régulent aussi bien la prolifération que la différenciation des diverses lignées. Présentement, le modèle de différenciation hypophysaire (Fig. 1.5) postule la présence d'un précurseur hypophysaire commun. Suite à l'action de différents signaux et facteurs de transcription, ce précurseur se dirige dans chacune des voies de différenciation où nous connaissons une multitude de marqueurs. Cependant, l'interrelation

prolifération/différenciation, c'est-à-dire les étapes qui précèdent la différenciation terminale, est totalement inconnue tout comme la preuve de l'existence d'un précurseur unique. L'hypophyse représente un excellent modèle pour étudier cette relation prolifération/différenciation (sujet qui sera l'objet du Chapitre 3).

4. TUMORIGÉNÈSE HYPOPHYSAIRE

L'hypophyse est l'un des organes les plus sensibles au développement de tumeurs chez l'homme et la souris. Les premières études autopsiques de la clinique Mayo en 1936 ont démontré dans la population nord-américaine une prévalence de 22.4% de tumeurs hypophysaires. Ces tumeurs demeurent habituellement non-diagnostiquées puisqu'elles sont le plus souvent de petites tailles et ne conduisent pas à une manifestation clinique ²⁰¹. Les tumeurs hypophysaires se distinguent aussi bien par leur fréquence que par leur diversité et comptent pour près de 10% des néoplasies intracrânielles. Elles sont le plus souvent bénignes, de tailles variables (macroadénome si supérieur à 10mm *versus* microadénomes si inférieur à 10mm) et peuvent être hétérogènes ou homogènes. Parmi les tumeurs hypophysaires les plus fréquentes, nous pouvons citer les prolactinomes (adénomes lactotropes sécrétant la PRL), les tumeurs des patients atteints d'acromégalie (adénomes somatotropes sécrétant la GH) ou de la maladie de Cushing (adénomes corticotropes sécrétant l'ACTH) et les tumeurs non-sécrétantes (adénomes non-fonctionnels). Cependant, les bases moléculaires de ces divers processus tumoraux demeurent inconnues. Qu'il soit question d'une cellule souche tumorale ou de dédifférenciation, aucune de ces hypothèses n'a été étudiée dans le contexte de la tumorigénèse hypophysaire.

4.1. LE CYCLE CELLULAIRE

Il existe un point commun à toutes les tumeurs, soit la dérégulation du cycle cellulaire. Les tumeurs hypophysaires n'échappent pas à cette règle. Le cycle cellulaire normal est constitué de quatre phases distinctes caractérisées par des propriétés bien précises (Fig. 1.6). Tout d'abord, pendant la phase G1, la cellule maintient une activité normale et augmente son volume cytoplasmique ainsi que le nombre de mitochondries en préparation de la phase S. La phase S consiste en la réplication du matériel génétique. Lorsque la cellule entre en phase G2, elle a terminé la duplication de son génome et est en attente de la ségrégation des chromosomes et la division qui s'effectuera en phase M. Par la suite, ces

nouvelles cellules filles peuvent continuer dans un autre cycle ou en sortir et jouer leur rôle biologique. Le contrôle du cycle cellulaire s'effectue par la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des cyclines qui en association avec les cdk (cyclin-dependent kinases) sont nécessaires à la progression du cycle en contrôlant les transitions entre les différentes phases. La plupart des premières études sur ce système ont été réalisées dans la levure ou dans des lignées cellulaires établies en culture : ceci a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de plusieurs protéines dans la progression du cycle cellulaire. Cependant, les premières études d'inactivation génétique chez la souris sont venues semer la confusion quant aux rôles physiologiques de ces protéines²⁰².

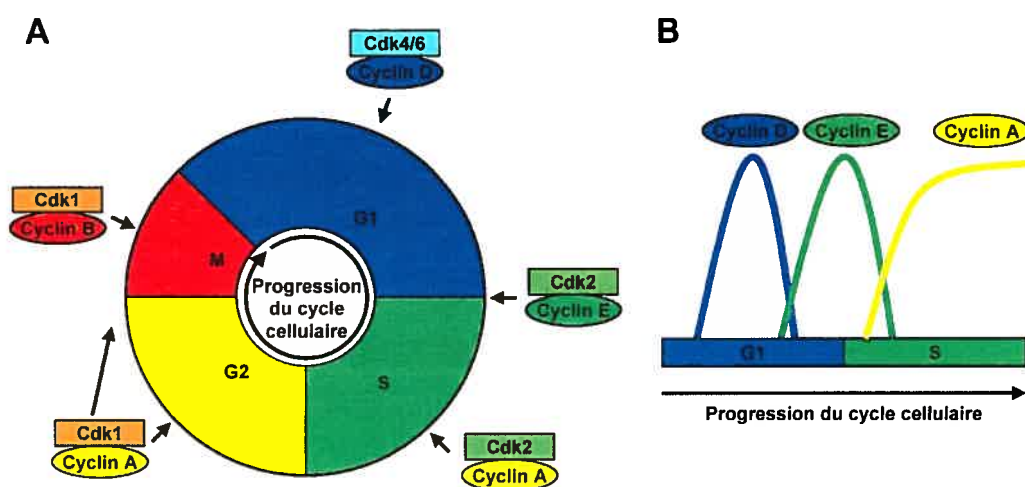


Figure 1.6. Le contrôle du cycle cellulaire

(A) Le cycle cellulaire se subdivise en quatre phases : G1, S, G2 et M. La progression et la transition entre chacune de ces phases sont contrôlées par des couples de cycline/CDK. (B) La cycline D est exprimée tôt durant la G1, la cycline E lors de la transition G1/S et la cycline A du début de la phase S jusqu'à la G2.

4.1.1. LES CYCLINES ET LES CDKS

Cycline D/*cdk4* et *cdk6*. Il existe trois gènes codant pour les cyclines D (D1, D2 et D3) dans les cellules de mammifères. Leur expression est induite très tôt lors du cycle cellulaire pour l'initiation de la phase G1 en réponse aux signaux

extérieurs²⁰³. L'interaction avec cdk4 ou cdk6 permet la phosphorylation de pRb ce qui libère le facteur de transcription E2F nécessaire pour l'activation des gènes impliqués dans la progression vers la phase S^{203,204}. L'ablation d'une seule cycline D chez la souris mène à des phénotypes subtils. Toutefois, la délétion simultanée des trois cyclines D est létale au jour embryonnaire e16.5, ce qui démontre qu'une partie du développement embryonnaire et la prolifération peut se faire en l'absence de ces cyclines²⁰⁵. La double invalidation de cdk4 et cdk6 confirme ce résultat à la différence que celui-ci est létal quelques jours plus tard²⁰⁶. Par conséquent, nous savons que ces facteurs jouent un rôle important lors du développement embryonnaire, mais leurs véritables fonctions physiologiques demeurent imprécises. Au niveau hypophysaire, les patrons d'expression ne sont pas définis, mais l'expression de cycline D1 corrèle avec la présence de tumeurs agressives et non-fonctionnelles²⁰⁷. Inversement, l'invalidation du gène de cdk4 chez la souris mène à une hypoplasie hypophysaire et un nombre réduit de cellules lactotropes et somatotropes²⁰⁸. Ces résultats suggèrent qu'au niveau hypophysaire, les complexes cyclines D/ckd4 sont impliqués dans la prolifération de la glande.

Cycline E/ckd2. Vers la fin de la phase G1, c'est la cycline E en association avec cdk2 qui prend le relais pour permettre l'initiation de la phase S. Le complexe cycline E/ckd2, phosphoryle une multitude de substrats impliqués dans diverses étapes de la réplication. La majorité des études prédisaient un rôle majeur voire essentiel des cyclines E1/E2 et cdk2 dans la progression du cycle cellulaire suite à des études d'injections d'anticorps^{209,210}. Cependant, les expériences d'invalidations géniques des cyclines E1 et E2 ainsi que de cdk2 n'ont pas confirmé ce rôle. La délétion simple de cycline E1 ou E2 étant viable²¹¹, la présomption était que la double invalidation des cyclines E1/E2 serait létale^{211,212}. De façon surprenante, l'inactivation des cyclines E1/E2 est létale au jour e11.5 suite à un défaut du placenta ce qui démontre le rôle essentiel de ces facteurs lors du développement embryonnaire, mais sème le doute sur le rôle essentiel de ces protéines dans la progression du cycle cellulaire^{211,212}. L'expression de la cycline E corrèle avec plusieurs formes de tumeurs²¹³. Du

nombre, nous retrouvons spécifiquement la maladie de Cushing par opposition aux autres tumeurs hypophysaires²⁰⁷. La fonction exacte de la cycline E dans les processus tumoraux est toujours inconnue, mais elle pourrait se situer au moment de la réentrée dans le cycle cellulaire^{211,214}.

Cycline A. Les études en cellules établies en culture ont démontré que l'expression de la cycline A débute avec la phase S et permet, grâce au recrutement de cdk2, la phosphorylation de facteurs nécessaires à la réplication de l'ADN tel que CDC6^{215,216}. Avec la cycline B, la cycline A agit comme un des régulateurs majeurs des phases S, G2 et M. Il existe deux cyclines A : 1) la cycline A1 qui est exprimée très tôt durant le développement embryonnaire, et pourrait contrôler la méiose 2) et la cycline A2 qui régule la division mitotique²¹⁷. L'inactivation de ces gènes a été effectuée chez la souris. Les souris femelles invalidées pour la cycline A1 ne présentent aucun phénotype apparent tandis que les mâles sont stériles suite à un arrêt de la spermatogénèse^{218,219}. Les souris cycline A2^{-/-} se développent jusqu'au stade de blastocyste, mais elles meurent après l'implantation²²⁰. Aucun rôle ou patron d'expression hypophysaire des cyclines A n'a été rapporté à ce jour.

Cycline B/cdc2 (cdk1). Tel que mentionné dans le précédent paragraphe, les cyclines B1, B2 et B3 sont exprimées dans la majorité des cellules prolifératives. Toutefois, leurs localisations et leurs rôles diffèrent. La cycline B1 est une protéine associée aux microtubules tandis que la cycline B2 s'associe à la membrane cellulaire^{221,222}. En association avec cdk1, la cycline B1 participe à la rupture de l'enveloppe nucléaire, à l'assemblage des fuseaux mitotiques et à la condensation des chromosomes tandis que la cycline B2 réorganise l'appareil de Golgi²²³. Alors que l'inactivation de la cycline B2 est viable et sans phénotype apparent, l'ablation de la cycline B1 mène à la mort *in utero*. Les raisons de cette létalité ne sont pas connues avec certitude²²⁴. Le troisième membre, la cycline B3, présente des caractéristiques des cyclines A et B²²⁵. Elle est exclusivement nucléaire, se lie à cdk2, et est exprimée dans les testicules et les ovaires en développement²²⁵. Malheureusement, l'inactivation de ce gène n'a pas encore été effectuée ce qui ne permet pas de nous prononcer quant à son rôle

physiologique. Aucune fonction ou patron d'expression hypophysaire n'ont été rapportés à ce jour.

Il existe une multitude d'autres cyclines (C, F, T) pouvant jouer des rôles très variés au niveau du cycle cellulaire, de la structure cellulaire ou de la transcription. Les dernières années ont révélé des différences marquées entre les fonctions des cyclines suggérées par les études en lignées cellulaires versus celles *in vivo*. Dorénavant, les études du cycle cellulaire doivent donc être faites en combinant ces deux approches.

4.1.2. LES INHIBITEURS DU CYCLE

Afin d'éviter une prolifération cellulaire excessive, la cellule s'est dotée d'inhibiteurs des cdk (cdki) qui permettent de freiner la progression du cycle. Ils se divisent en deux grandes familles basées sur leurs structures ainsi que la cdk ciblée : 1) la famille Cip/Kip qui interfère avec les cyclines D, E et A en inhibant cdk2 et 2) la famille INK4 (Inhibitor of cdk4) qui possède la capacité d'inhiber cdk4 et cdk6²⁰⁴.

4.1.2.1. La famille Cip/Kip

La famille Cip/Kip comprend trois membres : p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}. Les protéines de cette famille sont impliqués dans de nombreux processus biologiques autres que la régulation du cycle cellulaire²²⁶. Leur rôle de suppresseur de tumeur suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans la tumorigénèse hypophysaire.

p21^{Cip1} (cdkn1a). p21^{Cip1} a été identifié comme une cible transcriptionnelle de p53 suggérant un rôle potentiel de suppresseur de tumeur²²⁷. L'expression de p21^{Cip1} corrèle avec l'état de différenciation terminale de plusieurs tissus incluant les myocytes et les kératinocytes²²⁸. *In vitro*, il lie cdk2 et l'inactive²²⁹. *In vivo*, la fonction de p21^{Cip1} a été testée chez la souris. L'analyse des souris invalidées pour ce gène ne démontre aucun problème développemental ainsi qu'aucune tumeur spontanée dans les sept premiers mois²³⁰. Cependant, avec l'âge, les souris mutantes commencent à développer diverses formes de tumeurs

hématopoïétiques, endothéliales et épithéliales sans toutefois atteindre la fréquence des souris p53^{-/-} ²³¹. La délétion de p21^{Cip1} n'est pas suffisante pour générer des tumeurs hypophysaires avec une grande fréquence. Dans un faible pourcentage, une légère hyperplasie hypophysaire est observée chez les souris âgées de plus d'un an ²³². De plus, dans une étude comportant 28 tumeurs hypophysaires humaines aucune mutation dans le gène codant pour p21^{Cip1} n'a été identifiée, démontrant que cette protéine joue un rôle accessoire dans la tumorigénèse hypophysaire ²³³. Par conséquent, si la famille Cip/Kip est impliquée dans la tumorigénèse hypophysaire, il s'agit vraisemblablement d'un des deux autres membres.

p27^{Kip1} (*cdkn1b*). Le second membre de la famille Cip/Kip est p27^{Kip1} qui fut identifié comme la protéine responsable de l'arrêt du cycle cellulaire causé par TGF- β (Transforming Growth Factor-Beta) ²³⁴. La surexpression de p27^{Kip1} mène à l'arrêt du cycle cellulaire de différentes façons dans la majorité des lignées cellulaires. Il peut interagir aussi bien avec les complexes cycline D/cdk4/cdk6 que les complexes cdk2 avec cycline E ou A ^{234,235}. La régulation du niveau intracellulaire de p27^{Kip1} se fait au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. En effet, la phosphorylation sur le résidu Thr-187 par cdk2 permet la dégradation de la protéine par la voie de l'ubiquitine-protéasome ²³⁶. p27^{Kip1} se localise majoritairement dans le noyau, mais il peut se retrouver dans le cytoplasme où il joue un rôle de modulateur de la voie RhoA et dans la migration des cellules ²³⁷.

Le rôle le mieux documenté de p27^{Kip1} demeure celui de régulateur du cycle cellulaire. La délétion du gène chez la souris ne génère pas de défauts développementaux sévères puisque les souris sont viables. Cependant, ces souris présentent une hyperplasie des organes internes et une masse corporelle beaucoup plus élevée que la moyenne ²³⁸⁻²⁴⁰. L'augmentation de la masse corporelle ne provient pas d'une augmentation des cellules somatotropes (GH) hypophysaires ce qui aurait pu entraîner la croissance exagérée ²³⁸⁻²⁴⁰. Cependant, avec une pénétrance de 100%, les souris développent des hyperplasies/adénomes du lobe intermédiaire de l'hypophyse augmentant de 2 à

5 fois le volume de la glande en moins de 4 mois. Vraisemblablement, il n'y a que le lobe intermédiaire qui est affecté puisque la révélation de FSH, LH et GH n'a démontré aucun changement d'intensité ou du nombre des cellules qui les expriment ²³⁸. De ce fait, l'hypophyse représente un excellent modèle pour étudier le rôle suppresseur de tumeur de p27^{Kip1}. La délétion double de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} n'accélère pas le processus de tumorigénèse en général si ce n'est une légère accélération des hyperplasies ovariennes ²⁴¹. Tel que mentionné auparavant, p27^{Kip1} lie et inhibe la fonction catalytique des complexes contenant cdk2. Par conséquent, l'inactivation de cdk2 dans le fond génétique p27^{Kip1}^{-/-} devrait mener à une diminution, voir une abolition de la tumorigénèse. En réalité, il n'en est rien puisque les souris cdk2^{-/-}, p27^{Kip1}^{-/-} développent des tumeurs hypophysaires à la même fréquence et à la même vitesse que les souris p27^{Kip1}^{-/-} démontrant que cdk2 n'est pas la cible principale de p27^{Kip1} ²⁴². Toutefois, l'augmentation d'activité de cdc2 (cdk1) dans ces souris compenserait la perte de cdk2 ²⁴³. Malgré la pénétrance des tumeurs hypophysaires chez les souris p27^{Kip1}^{-/-}, il a été impossible de détecter des mutations dans ce gène dans les tumeurs hypophysaires humaines ^{233,244}. Néanmoins, on constate une expression moins importante de p27^{Kip1} dans les cellules corticotropes par rapport aux autres cellules hypophysaires ²⁴⁵. Potentiellement, ceci pourrait expliquer la sensibilité des cellules exprimant la POMC à la tumorigénèse.

Le contrôle de la prolifération et de la différenciation est essentiel au développement normal et au bon fonctionnement des divers organes. La perte de p27^{Kip1} entraîne l'apparition de défauts au niveau des ovaires et de la rétine. L'expression de p27^{Kip1} corrèle avec la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation des progéniteurs ²⁴⁶. Par exemple, durant le développement de l'épithélium de Corti, le neuroépithélium auditif de l'oreille interne chez les mammifères, la perte d'expression de p27^{Kip1} maintient la prolifération des progéniteurs des cellules sensorielles ²⁴⁷. De plus, il semble que la capacité proliférative d'une cellule différenciée soit totalement dépendante de sa capacité à diminuer l'expression de p27^{Kip1} ²⁴⁸.

Aussi bien dans la rétine que dans l'hypophyse, la régulation transcriptionnelle de $p27^{Kip1}$ s'effectue par le facteur à homéodomaine Six6. En association avec le corépresseur Dach, du moins en partie, Six6 réprime l'activité du promoteur de $p27^{Kip1}$. La délétion de Six6 entraîne un arrêt prématuré du cycle cellulaire menant à une légère hypoplasie hypophysaire ¹⁸⁰. En résumé, $p27^{Kip1}$ joue un rôle dans la sortie du cycle cellulaire et par conséquent sa perte entraîne une augmentation de la prolifération et donc l'apparition de tumeurs.

$p57^{Kip2}$ (*cdkn1c*). Le troisième membre de la famille Cip/Kip est le moins étudié. La délétion de $p57^{Kip2}$ mène à la mort des souris dans les premières heures suivant la naissance ce qui rend difficile l'étude de son rôle dans la tumorigénèse ²⁴⁹. Cependant, les phénotypes au niveau développemental sont nombreux et s'apparentent à ceux du syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). Cette maladie est causée par la perte de l'empreinte génétique du locus 11p15.5 qui inclue $p57^{Kip2}$ et se caractérise par une organomégalie, une macroglossie ainsi qu'un défaut de la paroi abdominale antérieure et une sensibilité accrue à la tumorigénèse ²⁵⁰. En fait, une mutation dans $p57^{Kip2}$ est présente dans 40% des cas de BWS familiaux comparativement à seulement 5% chez les cas sporadiques ^{251,252}. Normalement, seulement l'allèle maternel est transcrit ²⁵³. Chez la souris, l'inactivation du gène cause une altération de la prolifération et de la différenciation. En effet, les souris $p57^{Kip2-/-}$ souffrent d'une différenciation incomplète des chondrocytes, de défauts musculaires, d'une hyperplasie des glandes surrénales et d'une hyperprolifération de la rétine accompagnée d'une augmentation de l'apoptose ^{249,254}. La perte simultanée de $p57^{Kip2}$ et de $p27^{Kip1}$ résulte en une phénocopie de la souris $p57^{Kip2-/-}$ à l'exception d'un effet plus drastique au niveau de la rétine et une mort embryonnaire plus précoce. La perte de ces deux protéines entraîne un défaut dans la différenciation et l'élongation des cellules de la lentille ²⁵⁵.

L'expression de $p57^{Kip2}$ et $p27^{Kip1}$ est nécessaire pour la sortie du cycle cellulaire de différentes populations de progéniteurs rétiens ²⁵⁶. Ils peuvent aussi jouer le même rôle au niveau du pancréas, où l'expression de $p57^{Kip2}$ est nécessaire pour la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs et la protection contre

l'apoptose²⁵⁷. En combinaison avec p21^{Cip1}, p57^{Kip2} coordonne la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation des cellules musculaires. En effet, les souris p21^{Cip1}^{-/-}, p57^{Kip2}^{-/-} sont incapables de former des myotubes et montrent une augmentation de la prolifération des myoblastes²⁵⁸, les cellules précurseurs musculaires²⁵⁹. À ce jour, il n'y a aucune évidence pour un rôle de p57^{Kip2} dans la tumorigénèse ou le développement hypophysaire. Toutefois, les souris transgéniques créées à partir du BAC contenant les régions régulatrices de p57^{Kip2} montrent une expression très forte dans la poche de Rathke²⁶⁰. Le Chapitre 3 discutera de la fonction de p57^{Kip2} lors du développement hypophysaire. Il apparaît donc que la famille Cip/Kip joue un rôle extrêmement important durant le développement normal et l'arrêt du cycle cellulaire en plus de ses fonctions dans les cellules établies en culture.

4.1.2.2. La famille INK4

La deuxième grande famille de CKI importante pour la régulation du cycle cellulaire est la famille INK4 qui contient quatre protéines avec des domaines ankyrines soit : p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d}.

p16^{INK4a}. Le locus INK4a code pour deux protéines distinctes : p16^{INK4a} et p19^{ARF}²⁶¹. L'inactivation de ce locus chez la souris ne cause pas de défauts développementaux en accord avec l'expression de ces protéines exclusivement après la naissance²⁶². Cependant, ces souris développent spontanément différents types de tumeurs, mais il a été impossible de démontrer la présence accrue d'adénomes hypophysaires. Toutefois, dans les tumeurs hypophysaires humaines, on dénote une perte d'expression fréquente de p16^{INK4a} sans toutefois y retrouver de mutation^{263,264}.

p15^{INK4b}. Tout comme p16^{INK4a}, les souris p15^{INK4b} sont viables. Les animaux mutants développent une hématoïèse extramédullaire et une hyperplasie au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques²⁶⁵. Encore une fois, cette protéine ne semble pas être impliquée au niveau hypophysaire puisque les souris p15^{INK4b}^{-/-} ne développent pas de tumeurs hypophysaires et aucune mutation n'a été retrouvée dans les tumeurs humaines²⁶³.

p18^{INK4c}. Au niveau hypophysaire, le membre le plus important de la famille INK4 est p18^{INK4c}. En effet, suite à un développement embryonnaire normal, les souris p18^{INK4c}^{-/-} développent des tumeurs hypophysaires mélanotropes tout comme les souris p27^{Kip1}^{-/-} ^{265,266}. Toutefois, l'effet suppresseur de tumeur de p27^{Kip1} et p18^{INK4c} passe par deux voies de signalisation différentes. En effet, la double invalidation de p18^{INK4c} et de p27^{Kip1} entraîne une accélération du développement des tumeurs hypophysaires ²⁶⁶ ce qui n'est pas le cas du double mutant p18^{INK4c}^{-/-}, p21^{Cip1}^{-/-} ²³². En plus de ce phénotype hypophysaire, les souris p18^{INK4c}^{-/-} développent des kystes au niveau des reins et des glandes mammaires ^{265,266}. Des évidences génétiques suggèrent que l'inhibition par p18^{INK4c} s'effectue sur les complexes cycline D/cdk4. En effet, la perte de cdk4 inhibe l'apparition des tumeurs causées par la perte de p18^{INK4c}, et non celles causées par la perte de p27^{Kip1} ²⁶⁷. De plus, une diminution significative de p18^{INK4c} a été notée dans les tumeurs corticotropes ²⁶⁸. Par conséquent, la perte d'expression ou une mutation de p18^{INK4c} pourrait être l'une des causes de l'apparition d'un adénome corticotrope.

p19^{INK4d}. Le dernier membre, p19^{INK4d}, se distingue des trois autres par l'incapacité de la souris mutante à produire des tumeurs spontanées ²⁶⁹. Cependant, ces souris développent une hypoplasie testiculaire menant à l'infertilité des mâles ²⁶⁹ ainsi qu'une perte progressive de l'ouïe due à une perte de l'état postmitotique des cellules sensorielles ²⁷⁰. Au niveau hypophysaire, la perte de p19^{INK4d} est incapable d'accélérer l'apparition du phénotype des souris p18^{INK4c} ²⁷¹. Par conséquent, des membres de la famille INK4, c'est p18^{INK4c} qui semble jouer un rôle prédominant au niveau hypophysaire.

Table II – Fonctions hypophysaires des régulateurs du cycle cellulaire

Gènes invalidés	Survie	Phénotypes Hypophysaires	Références
Cycline D1-D3	Létal e16.5	N.D.	272
Cycline E1, E2	Létal e11.5	N.D.	211
Cdk2	Viable	Aucun phénotype	242,243
Cdk4	Viable	Hypoplasie Adénocarcinomes du lobe antérieur	208,273 274
p21 ^{Cip1}	Viable	Aucun phénotype	230
p27 ^{Kip1}	Viable	Adénomes du lobe intermédiaire (100%)	238-240
p57 ^{Kip2}	Létal néonatal	Chapitre 3 du présent travail	
p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1}	viable	Idem que p27 ^{Kip1}	241
p21 ^{Cip1} , p57 ^{Kip2}	Létal	N.D.	258
p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2}	Létal e12-e16.5	N.D.	255
p27 ^{Kip1} , cdk2	Viable	Accélération du développement des tumeurs	242,243
p27 ^{Kip1} , cdk4	Viable	Addition des tumeurs	275
p16 ^{INK4a}	Viable	Aucun phénotype	276,277
p15 ^{INK4b}	Viable	Aucun phénotype	265
p18 ^{INK4c}	Viable	Adénomes (100%)	265,266
p15 ^{INK4b} , p18 ^{INK4c}	Viable	Idem que p18 ^{INK4c}	265
p19 ^{INK4d}	Viable	Aucun phénotype	271
p18 ^{INK4c} , cdk4	Viable	Réduction de la fréquence des tumeurs	267
p18 ^{INK4c} , p21 ^{Cip1}	Viable	Accélération du développement des tumeurs	232
p18 ^{INK4c} , p27 ^{Kip1}	Viable	Accélération du développement des tumeurs	232
pRb +/-	Viable	Adénocarcinomes du lobe intermédiaire (100%)	90
pRb +/-, p21 ^{Cip1}	Viable	Accélération du développement des tumeurs	232
pRb +/-, p27 ^{Kip1}	Viable	Accélération du développement des tumeurs	278
pRb +/-, E2F1	Viable	Réduction de la fréquence des tumeurs	270
pRb +/-, E2F3	Viable	Réduction de la fréquence des tumeurs	280
pRb +/-, E2F4	Viable	Réduction de la fréquence des tumeurs	281

N.D. : Non-Disponible

4.2. LES AUTRES ONCOGÈNES ET SUPPRESSEURS DE TUMEURS HYPOPHYSAIRES

Au fil des années, plusieurs autres modèles de souris pouvant développer des tumeurs hypophysaires ont été créés. Étonnamment, p53 qui joue un rôle

important dans le processus tumoral de plusieurs tissus, ne semble pas jouer de rôle au niveau hypophysaire ²²⁷. Ce résultat est intrigant puisque nous comptons p21^{Cip1} et p27^{Kip1} dans les cibles transcriptionnelles directes de p53 ²²⁷. Toutefois, d'autres facteurs peuvent influencer des étapes clés du cycle cellulaire. La Table II résume différentes mutations de ces facteurs et les phénotypes hypophysaires qui ont été décrits dans la littérature.

4.2.1. RB

Un des régulateurs majeurs de la transition entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire est la famille pRb qui se compose de pRb, p107 et p130 ²⁸². Le complexe cycline D/cdk4 est responsable de la phosphorylation de pRb ce qui permet de lever l'inhibition sur E2F et ainsi permettre la transcription des gènes nécessaires à la phase S ²⁸³. La délétion de pRb chez la souris mène à la mort *in utero* ^{90,284,285} contrairement à p107 et p130 qui sont tous les deux viables ²⁸⁶. Avec une pénétrance de 100%, les souris pRb^{+/-} développent des hyperplasies du lobe intermédiaire ²⁸⁷. Chez l'humain, la perte de pRb corrèle avec les tumeurs hypophysaires avancées en comparaison avec les adénomes bénins ²⁸⁸. Chez la souris, l'évolution de ces adénomes hypophysaires est ralentie par la perte de E2F-1 et complètement supprimée par la perte de E2F-4 ce qui confirme que la suppression de la croissance par pRb dépend de l'inhibition de E2F ^{279,289}. En fait, l'expression simple de E2F-3 est suffisante pour créer des adénomes hypophysaires ²⁹⁰ tandis que sa délétion bloque la tumorigénèse ²⁸⁰. De plus, la perte de pRb en combinaison avec un membre de la famille Cip/Kip accélère le développement des tumeurs hypophysaires ce qui suggère qu'ils sont impliqués dans des points de contrôles différents du cycle cellulaire ^{232,266}. Étant donné les résultats obtenus avec les souris mutantes pour pRb, p18^{INK4a} et cdk4, il paraît évident que la régulation de la transition G1-S est un élément clé de la tumorigénèse hypophysaire.

4.2.2. PTTG

PTTG (pituitary tumor transforming gene) est un oncogène associé à la tumorigénèse hypophysaire. Il est surexprimé dans près de 90% des adénomes hypophysaires humains ²⁹¹. L'expression ectopique de PTTG humain chez la souris à l'aide du promoteur hypophysaire de l' α GSU mène à différentes tumeurs hypophysaires exprimant LH, FSH, TSH et même GH ²⁹². À l'opposé, la perte de PTTG mène à une hypoplasie hypophysaire qui de plus permet de résister à la tumorigénèse induite dans les souris pRb+/- ²⁹³. La surexpression de PTTG dans ce même fond génétique accélère le développement de ces tumeurs ²⁹⁴. Le rôle de l'oncogène PTTG semble donc être intimement lié à celui du suppresseur de tumeur pRb.

Malgré la présence de nombreux modèles de tumorigénèse hypophysaire, beaucoup de travail reste à faire pour mieux comprendre l'origine moléculaire de ces tumeurs. De plus en plus d'évidences suggèrent que les régulateurs du cycle cellulaire jouent des rôles importants lors du développement embryonnaire. En fait, le contrôle de la prolifération est aussi important pour le développement normal que le processus tumoral. Ainsi, il n'est pas étonnant de retrouver des facteurs responsables de l'arrêt du cycle cellulaire lors du développement normal invalidés dans certaines tumeurs. Les multiples outils dont nous disposons rendent l'hypophyse un excellent modèle pour étudier aussi bien le développement que la tumorigénèse (sujets des Chapitres 3 et 4).

5. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Depuis plusieurs années, mon laboratoire d'accueil s'est intéressé à la biologie des cellules corticotropes. Plusieurs approches ont été utilisées que ce soit au niveau de la réponse hormonale du promoteur POMC ou de la différenciation des cellules corticotropes. À mon arrivée au laboratoire, je me suis intéressé plus spécifiquement à la maladie de Cushing en abordant les aspects de résistance hormonale aussi bien que le processus de tumorigénèse. Par la suite, l'étude du développement hypophysaire a permis d'établir une première esquisse de la séquence d'événements menant le progéniteur non-différencié à la cellule corticotrope mature. À long terme, le but est de comprendre les liens entre la prolifération, la différenciation, la tumorigénèse et la réponse hormonale des cellules corticotropes.

Le premier concept que j'ai étudié est la résistance aux Gc associée à maladie de Cushing où la boucle de rétroinhibition exercée par les Gc est partiellement déficiente. Par conséquent, une connaissance plus approfondie des protéines essentielles à la réponse aux Gc au niveau du promoteur de POMC proposera des hypothèses sur la pathogénèse de la maladie de Cushing. L'hypothèse est la suivante : si une protéine est essentielle pour la répression par les Gc, elle pourrait être exprimée de façon aberrante dans une tumeur résistante aux Gc. Le Chapitre 2, publié dans la revue *Genes & Development*, contient les résultats que j'ai obtenus sur les protéines essentielles à la trans-répression entre GR et NGFI-B. J'ai identifié les protéines Brg1, la sous-unité ATPase des complexes Swi/Snf, ainsi que HDAC2 comme des facteurs requis pour la répression. En utilisant des techniques de coimmunoprécipitation, d'immunoprécipitation de la chromatine et d'interférence à l'ARN, j'ai caractérisé ces complexes au niveau du promoteur de POMC. Mon résultat le plus frappant est sans aucun doute l'expression aberrante de Brg1 et HDAC2 dans les adénomes corticotropes de la maladie de Cushing.

La perte de Brg1 et HDAC2 dans la maladie de Cushing représente une explication de la résistance hormonale. Cependant, conduit-elle à la formation de

tumeurs ? En fait, nous ne savons rien des étapes menant à l'établissement des cellules corticotropes d'un point de vue du cycle cellulaire. Avant de poser la question spécifique de la prolifération des cellules corticotropes, le Chapitre 3, s'intéresse aux étapes préalables à l'établissement de la lignée lors du développement hypophysaire. L'approche que j'ai choisie repose sur l'analyse du cycle cellulaire *in vivo*. J'ai pu, avec l'aide d'Audrey Roussel, une étudiante sous ma supervision, établir une séquence d'événement allant du précurseur prolifératif jusqu'à la cellule différenciée. Le Chapitre 3 met en évidence le découplage entre la prolifération et la différenciation lors du développement hypophysaire en plus de caractériser en détail la fonction de p57^{Kip2} dans cette séquence. Ces travaux sont l'objet d'une publication soumise récemment à *Developmental Cell*.

Le but ultime serait néanmoins de déterminer les causes de la tumorigénèse dans la maladie de Cushing. Des indices ont émergé des Chapitre 2 et 3. Le premier vient du fait que Brg1 est un suppresseur de tumeur potentiel²⁹⁵. Parmi les gènes qu'il réprime, nous retrouvons la cycline E et j'ai pu corrélérer son expression avec notre panel de tumeurs hypophysaires de patients atteints de la maladie de Cushing. Le deuxième indice est que l'inhibiteur p27^{Kip1} est exprimé seulement dans les cellules différenciées, dont les cellules POMC. J'ai émis l'hypothèse que la balance entre l'expression de cycline E et p27^{Kip1} contrôle la prolifération des cellules POMC. Le Chapitre 4 présente les évidences chez l'humain et la souris que la surexpression de cycline E ainsi que la perte de p27^{Kip1} sont des événements clés de la tumorigénèse corticotropes et mélanotropes. Ces résultats sont en préparation pour publication.

Globalement, l'ensemble de mes travaux a permis d'établir un schéma de base des différents points de contrôle du cycle cellulaire lors du développement hypophysaire et de l'établissement des cellules corticotropes. Un facteur tel que Brg1 permet de faire le lien entre la tumorigénèse et la résistance hormonale. En effet, sa présence est requise pour la trans-répression, mais aussi pour le contrôle transcriptionnel de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire. Cependant,

la question demeure : quel événement arrive le premier, la résistance hormonale ou la tumorigénèse?

6. CONTRIBUTION DES AUTEURS

Les résultats présentés dans les prochains Chapitre proviennent de résultats originaux qui ont été publiés, soumis ou en préparation pour publication. En tant que premier auteur, je suis à l'origine de la majorité des idées et concepts élaborés en plus d'avoir réalisé la majorité des expériences.

Chapitre 2 :

J'ai réalisé la totalité des expériences. Sophie Vallette-Kasic a permis le contact avec les divers cliniciens et par conséquent la partie clinique de nos interprétations. Les autres co-auteurs ont permis l'accès aux différents spécimens de tumeurs corticotropes utilisés.

Chapitre 3 :

J'ai réalisé la majorité des expériences. Audrey Roussel-Gervais a contribué à la mise au point des immunofluorescences pour plusieurs anticorps en plus d'effectuer certaines dissections.

Chapitre 4 :

J'ai réalisé la majorité des expériences. Audrey Roussel-Gervais a réalisé certaines immunofluorescences en plus de participer à l'établissement de la lignée transgénique.

CHAPITRE 2 : ROLE OF BRG1 AND HDAC2 IN GR TRANS- REPRESSION OF PITUITARY POMC GENE AND MIS- EXPRESSION IN CUSHING DISEASE

Steve Bilodeau¹, Sophie Vallette-Kasic¹, Yves Gauthier¹, Dominique Figarella-Branger², Thierry Brue², France Berthelet³, André Lacroix³, Dalia Batista⁴, Constantine Stratakis⁴, Jeanette Hanson⁵, Björn Meij⁵, Jacques Drouin^{1†}

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

² Laboratoire Interactions cellulaires neuroendocriniennes (ICNE)
Université de la Méditerranée, CNRS UMR 6544
Institut Jean-Roche, Marseille FRANCE

³ Department of Medicine, Research Center, Hotel-Dieu du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Québec, Canada

⁴ Section on Endocrinology and Genetics (SEGEN), Developmental Endocrinology Branch (DEB), National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), Bethesda, Maryland, USA

⁵ Department of Clinical Sciences of Companion Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

†To whom correspondence should be addressed:

Jacques Drouin
Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)
110, avenue des Pins Ouest
Montréal QC Canada H2W 1R7
Tel: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575
[REDACTED]

1. AVANT-PROPOS

La boucle de rétroinhibition exercée par les Gc sur la transcription de POMC est un aspect essentiel de l'homéostasie de l'axe HPA. Cette rétroinhibition par les Gc s'exerce par l'interaction de leur récepteur (GR) avec le récepteur nucléaire orphelin NGFI-B. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette trans-répression ne sont toujours pas connus. Nous savons néanmoins que dans la maladie de Cushing, la perte de la répression par GR est associée à la présence de tumeurs hypophysaires corticotropes.

Cette étude présente les bases du mécanisme moléculaire de la trans-répression par GR sur le promoteur de POMC. Les résultats démontrent le rôle essentiel de deux protéines, Brg1 et HDAC2, dans la répression de GR sur l'activité transcriptionnelle dépendante de NGFI-B. Brg1 s'avère jouer un rôle de protéine d'échafaudage du complexe trans-répresseur tandis que l'activité enzymatique de HDAC2 est requise pour la répression. Le fait marquant de cette étude qui renforce sa pertinence *in vivo* est l'expression aberrante de Brg1 et HDAC2 dans près de 50% des tumeurs corticotropes des individus atteints de la maladie de Cushing. Ces résultats offrent une première explication moléculaire de la résistance hormonale chez ces patients.

2. SUMMARY

Negative feedback regulation of the proopiomelanocortin (POMC) gene by the glucocorticoid (Gc) receptor (GR) is a critical feature of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and it is in part exerted by trans-repression between GR and the orphan nuclear receptors related to NGFI-B. We now show that Brg1, the ATPase subunit of the Swi/Snf complex, is essential for this trans-repression and that Brg1 is required *in vivo* to stabilize interactions between GR and NGFI-B as well as between GR and HDAC2. Whereas Brg1 is constitutively present at the POMC promoter, recruitment of GR and HDAC2 is ligand-dependent and results in histone H4 deacetylation of the POMC locus. In addition, GR-dependent repression inhibits promoter clearance by RNA polymerase II. Thus, co-recruitment of repressor and activator at the promoter and chromatin modification jointly contribute to trans-repression initiated by direct interactions between GR and NGFI-B. Loss of Brg1 or HDAC2 should therefore produce Gc resistance and we show that about 50% of Gc-resistant human and dog corticotroph adenomas which are the hallmark of Cushing disease, are deficient in nuclear expression of either protein. In addition to providing a molecular basis for Gc resistance, these deficiencies may also contribute to the tumorigenic process.

3. INTRODUCTION

Important aspects of glucocorticoid (Gc) action are exerted through repression of transcription^{112,296} such as their anti-inflammatory action²⁹⁷. Contrary to activation of transcription resulting from DNA binding of the glucocorticoid receptor (GR), repression by GR is often achieved through protein:protein interactions and mutual antagonism with other transcription factors. The first proposal of a mechanism for this type of transcriptional repression, now known as trans-repression, involved GR antagonism of AP-1-dependent transcription on the collagenase 1 gene^{109,110,298}. Many features of this mechanism of repression were revealed in this early work: mainly, Gc-dependent repression is mediated by GR but without direct GR:DNA interactions as for GR-activated transcription⁷⁹. Rather, GR represses transcription through protein:protein interactions with DNA-bound AP-1. In contrast to GR activation of transcription, Gc-dependent trans-repression by GR is exerted by monomers¹¹³ and consequently, is independent of dimerization^{112,122}. Direct protein interactions between GR and AP-1 (jun/fos) were observed and initially led to the suggestion that complex formation between these factors titrated AP-1 away from transcription targets, thus resulting in apparent repression. It was later shown by *in vivo* footprinting that promoter occupancy is not altered in the repressed state and thus, a model of repressors interacting with promoter-bound activators was proposed¹¹⁴. This mechanism was shown to be reciprocal, such that activators (such as GR, AP-1, NFκB or NGFI-B) can behave as either activator or repressor with the DNA-bound factor acting as activator. Trans-repression was also shown to occur between AP-1 and different nuclear receptors (NR) in addition to GR [reviewed in⁹⁷].

The anti-inflammatory action of Gc is largely exerted by its repressor activity²⁹⁹. Indeed, repression by GR of NFκB action on genes encoding pro-inflammatory cytokines such as interleukin 8 (IL-8)²⁹⁷ was suggested to use similar mechanisms of trans-repression as those between GR and AP-1⁹⁷. Recent insights into the molecular mechanism of GR trans-repression of the NFκB-

activated IL-8 gene followed the introduction of the chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique that confirmed and extended the trans-repression model: in this case, GR does not inhibit formation of a preinitiation complex but rather interferes with phosphorylation of the RNA polymerase II (Pol II) C-terminal repeat (CTD) at serine 2¹¹⁷ and with recruitment of p-TEFb, the Ser2 CTD kinase. In this system, failure to recruit p-TEFb appeared to decrease gene expression at a post-initiation step¹¹⁸. More recently, trans-repression initiated by another nuclear receptor, PPAR γ , was shown to depend on ligand-induced SUMOylation of the PPAR γ ligand binding domain and the resulting stabilization of its interaction with the co-repressor NCor³⁰⁰.

We have investigated the mechanism of Gc repression of the pituitary proopiomelanocortin (POMC) gene. Pituitary POMC is at the center of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis that ultimately controls Gc synthesis and that modulates the stress response, energy metabolism and immune. Central activation of the HPA axis is mediated through secretion of hypothalamic CRH into the pituitary portal system where CRH stimulates secretion of pre-synthesized POMC-derived ACTH and transcription of the POMC gene¹²¹. Blood-borne ACTH is the major stimulus of adrenal Gc synthesis, and maintenance of physiological levels of cortisol requires adequate negative feedback regulation by Gc of pituitary ACTH secretion and POMC gene transcription. Disregulation of this negative feedback loop has severe metabolic consequences that characterize Cushing disease.

Cushing syndrome, or hypercortisolism, is characterized by upper body obesity (moon face and buffalo hump), muscle weakness, high blood pressure and glucose intolerance. This condition is caused by elevated blood Gc that may result from high dose Gc treatment, excessive cortisol production by adrenal tumors, and in most non-iatrogenic cases, over-production of ACTH by ectopic or pituitary tumors³⁰¹. Typically, ACTH-producing pituitary tumors are microadenomas that are not malignant, produce excessive amounts of ACTH and are resistant to Gc negative feedback. These tumors define Cushing disease (as opposed to syndrome) and they appear to be due to tumorigenic

transformation of anterior pituitary corticotroph cells³⁰². The corticotrophs are one of two pro-opiomelanocortin (POMC)-expressing pituitary lineages¹⁹⁷ and they are at the center of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. The development of Gc resistance in corticotroph adenomas may be a critical (and possibly primary) step in tumorigenesis.

Although various human pathological conditions, such as Cushing disease and depressive illness have been associated with deficient Gc feedback, little mechanistic insight exists into the molecular defects causing Gc resistance, except for a few rare mutations in GR itself³⁰³. We have used Gc/GR repression of POMC gene transcription to gain insight into mechanisms of Gc resistance. Repression of POMC gene transcription by Gc results, at least in part, from trans-repression exerted by GR on the activity of orphan NRs related to NGFI-B¹²¹. Indeed, transcription elicited by NGFI-B (Nur77) and by the closely related orphan NRs, Nurr1 and NOR1, is subject to GR repression by a mechanism that is very similar to trans-repression between GR and AP-1 and between GR and NFκB^{121,122}. In pituitary corticotroph cells that produce ACTH, NGFI-B and its related NRs are mediators of the stimulatory signals elicited by CRH^{57,76}. Acting through its membrane receptors, CRH leads to activation of PKA and MAPK pathways that quickly result in: 1) dephosphorylation of the NGFI-B DNA-binding domain (DBD) that is required for NGFI-B interaction with DNA, 2) formation of Nur factor dimers that recognize the POMC promoter NurRE sequence and 3) recruitment of the NR coactivator SRC-2 (TIF2) to the AF-1 domain of NGFI-B⁷⁷. CRH signals also act on the POMC promoter through SRC2 coactivation of Tpit⁹¹, a highly cell-restricted T-box transcription factor³⁵. Although both NGFI-B and Tpit activities are enhanced in response to SRC2 and CRH signals, only NurRE-dependent activity is subject to Gc repression¹²².

We now report on the molecular mechanism of trans-repression between GR and NGFI-B, and in particular on the requirement for the Swi/Snf chromatin remodeling protein Brg1 and its ATPase activity in this mechanism. Brg1 is critical for formation of stable *in vivo* complexes between GR and NGFI-B, and

between GR and HDAC2. Promoter recruitment of both GR and HDAC2 are Gc-dependent and are associated with decreased acetylated histone H4 at the promoter and throughout the gene. Assembly of a trans-repression machinery at the POMC promoter also appears to hamper initiation of transcription by blocking Pol II at the promoter. Protein:protein interactions at the promoter between activator (NGFI-B) and repressor (GR) together with histone deacetylation result in inhibition of transcription initiation. Further, we found that about 50% of pituitary adenomas from Cushing disease patients or dogs, have misexpression of either Brg1 or HDAC2 in tumor tissue but not in adjacent normal pituitary tissue. The high frequency of misexpression of these proteins in corticotroph adenomas clearly supports their importance in Gc negative feedback regulation and in Gc resistance syndromes.

4. RESULTS

4.1. BRG1 OR BRM ARE REQUIRED FOR TRANS-REPRESSION BETWEEN GR AND NGFI-B

We have identified the POMC gene promoter NurRE element and its cognate transcription factors, NGFI-B and the related NRs, as the primary target for repression of POMC transcription by GR^{121,122}. Trans-repression between NGFI-B and GR can be monitored using simple reporter plasmids containing the NurRE or GRE. When we assessed the sensitivity of the NurRE reporter to Gc repression in a panel of cell lines, we realized that a subset of cells do not support transcriptional antagonism between NGFI-B and GR. Indeed, while CV-1 cells are subject to Dex- and GR-dependent repression of NGFI-B activity (Fig. 2.1A), C33A, SW13 and A-427 cells are insensitive to Gc/GR action (Fig. 2.1B, C, J). Conversely, CV-1 cells exhibit antagonism of GR-dependent transcription by NGFI-B (Fig. 2.1E) while C33A (Fig. 2.1F) and SW13 cells (Fig. 2.1G) do not support this antagonism. Expression of GR and NGFI-B was similar in cells that support or not antagonism (Supplemental Fig. S2.10). Since C33A and SW13 cells are deficient in Rb expression³⁰⁴ and given the role of Rb in CRH responsiveness⁸⁹, we assessed the importance of Rb and the related pocket proteins p107 and p130 in trans-repression. To this end, we used mouse embryo fibroblasts (MEF) that are deficient in all three pocket proteins (TKO)³⁰⁵. These MEF TKO cells appeared to be fully capable of supporting trans-repression by GR of NGFI-B-dependent activity (Fig. 2.1D) as well as NGFI-B repression of GR-dependent activity (Fig. 2.1H). These results clearly indicate that Rb-related proteins are not required for trans-repression between GR and NGFI-B.

Another common property of C33A, SW13 and A-427 cells is that they do not express significant levels of the SWI/SNF proteins Brg1 or Brm³⁰⁴ as verified by Western blot whereas AtT-20, MEF TKO and CV-1 cells express at least one of these proteins (Fig. 2.1I). Since the A-427 lung adenocarcinoma cells express Rb-related proteins³⁰⁴, we used them to assess the importance of Brg1 or Brm in GR repression. Expression of either Brg1 (Fig. 2.1K) or Brm (Fig. 2.1L) is

sufficient to fully restore GR- and Gc-dependent repression of NGFI-B-dependent activity. It is noteworthy that expression of either Brg1 or Brm slightly but significantly increased basal transcriptional activity (Fig. 2.1K, L compared to J). These experiments suggest that Brg1 is essential for GR repression of NGFI-B-dependent transcription.

4.2. BRG1 IS ESSENTIAL FOR GC REPRESSION OF POMC GENE TRANSCRIPTION

Brg1 is expressed by most cells and particularly by POMC (ACTH)-positive cells as revealed by immunohistochemistry (Fig. 2.2A). In AtT-20 cells, a model of POMC-expressing pituitary corticotroph cells, Brg1 appears to be expressed at about 10 times higher levels than Brm as assessed by RT-QPCR (Fig. 2.2B).

As these data suggest that Brg1 is predominantly expressed in POMC cells, we directly tested its role in Gc feedback repression of POMC using shpRNA expression plasmids in AtT-20 cells to knock-down Brg1 expression as ascertained by Western blot (Fig. 2.2C). The importance of Brg1 was assessed by co-transfection of a POMC-luciferase reporter together with shpRNA expression plasmids against Brg1 (Fig. 2.2D) or a random sequence (Fig. 2.2E). Knock-down of Brg1 expression decreased basal POMC promoter activity by almost 50% and the residual (but significant) activity was no longer repressible by Dex. It thus appears that part of basal POMC promoter activity is dependent on Brg1 and that it is this activity which is targeted by Dex repression. When similarly transfected and FACS-sorted AtT-20 cells were assessed for endogenous POMC (Fig. 2.2F) and Brg1 (Fig. 2.2G) mRNA levels, it was also found that constitutive POMC mRNA levels are reduced by about 50% and that the remaining expression is relatively resistant to Dex repression. Thus in absence of Brg1, POMC expression and promoter activity appear to become Dex-resistant in agreement with the importance of this protein for trans-repression between GR and NGFI-B (Fig 2.1).

4.3. BRG1 INTERACTS WITH BOTH NGFI-B AND GR

We have previously shown that Gc repression of POMC promoter activity is exerted through trans-repression involving direct protein-protein interactions between GR and NGFI-B [Fig. 2.3A and ¹²²]. The involvement of Brg1 in Gc repression of NGFI-B activity may result from interactions between Brg1 and NGFI-B and/or GR. In order to assess these putative interactions, we used immunoprecipitation of Flag-tagged NGFI-B from extracts of transfected C33A cells. This resulted in co-precipitation of Brg1 (Fig. 2.3B, lane 2) and similar results were obtained for Brm (Fig. 2.3C, lane 2). It was previously shown that GR interacts physically with Brg1 ¹⁰¹ and in similar co-immunoprecipitations, we showed co-precipitation of HA-tagged Brm with GR (Fig. 2.3D, lane 2). We then used available mutants of Brg1 and Brm to first assess structural requirements for interaction with NGFI-B or GR. For Brg1, the ATPase-deficient mutant K798R was as efficiently co-precipitated with NGFI-B as the wild-type protein (Fig. 2.3B, lane 3). Similarly, the mNTP mutant of Brm was also efficiently co-immunoprecipitated with NGFI-B (Fig. 2.3C, lane 3) and with GR (Fig. 2.3D, lane 3). Using deletion mutants of Brm, we could show that both NGFI-B and GR interactions required the Brm N-terminus (Δ N, Fig. 2.3C, lane 4 and 2.3D, lane 4), but not the Brm C-terminus (lanes 5 of Fig. 2.3C and D). We then tested whether Brg1 and Brm could interact directly with NGFI-B. A pull-down assay using a MBP-NGFI-B fusion protein was used to show interactions with Brg1 and Brm but less so with another Swi/Snf protein BAF155 (Fig. 2.3E).

In order to test the importance of Brg1 or Brm domains in trans-repression, we used the reconstituted system in A-427 cells in which trans-repression is dependent on ectopic expression of Brg1 or Brm (Fig. 2.1J-L). Interestingly, the ATPase-deficient Brg1 K798R and Brm mNTP mutants that retain the ability to interact with NGFI-B and GR, are both unable to reconstitute trans-repression (Fig. 2.3F and G). This result clearly indicates a dependence on ATPase activity for trans-repression. In agreement with the deletion analysis for protein interactions, deletion of the Brm N-terminus (Δ N) prevented reconstitution of trans-repression (Fig. 2.3F). These analyses clearly implicate many domains of

Brg1/Brm in the process of trans-repression and they corroborate the co-immunoprecipitation analyses.

4.4. BRG1 IS REQUIRED *IN VIVO* FOR COMPLEX FORMATION BETWEEN GR AND NGFI-B

We next wanted to verify that Brg1, GR and NGFI-B are present at the POMC promoter and that their recruitment coincides with trans-repression. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP), we first assessed recruitment of Brg1 to the POMC promoter. In these experiments, promoter recruitment was compared to the presence of proteins over exon 3 of the POMC gene which lies 6 kb downstream (Fig. 2.4A). Further, promoter recruitment was assessed in basal conditions as well as in activated and repressed states (Fig. 2.4B). It is noteworthy that Brg1 is present at the POMC promoter in basal conditions and that promoter occupancy is not altered by either activation (CRH) or repression (Dex) of transcription (Fig. 2.4C). Brg1 also exhibits significant presence at the 3'-end of the gene³⁰⁶ and although differences are not significant, the amount of Brg1 over exon 3 has a tendency to follow the effects of hormone treatment on transcription. The recruitment of Pitx1, a factor involved in basal POMC transcription³⁰ and showing *in vitro* interaction with Brg1 (Fig. 2.3E), is also constant and unchanged by hormonal stimulation (Fig. 2.4D). Promoter presence of Brg1 in basal conditions is consistent with its purported role in basal POMC transcription as suggested by the shpRNA experiments (Fig. 2.2D). In agreement with a model of Gc repression that depends on nuclear translocation and promoter recruitment of ligand-activated GR, we observed recruitment of GR at the POMC promoter in presence but not in absence of Dex; in contrast, no GR recruitment was observed over POMC exon 3 sequences (Fig. 2.4E). Similarly, POMC promoter recruitment of NGFI-B was observed upon CRH activation and NGFI-B recruitment was not observed over exon 3 (Fig. 2.4F). Co-recruitment of GR with NGFI-B in Dex/CRH-treated cells is consistent with the protein:protein interaction model of trans-repression (Fig. 2.3A). These data indicate that involvement of Brg1 in a trans-repression complex would presumably involve *de novo* association of GR with Brg1 that is already present at the promoter.

Previous work had shown direct *in vitro* interaction between GR and NGFI-B¹²², and thus these data did not indicate a requirement for another protein such as Brg1. In order to define the role of Brg1, we first assessed the putative interaction of GR and NGFI-B *in vivo* using co-immunoprecipitation in Brg1-deficient C33A cells. When Flag-NGFI-B and GR were co-expressed, immunoprecipitation of NGFI-B was not sufficient to co-precipitate GR (Fig. 2.4G lane 1). On the other hand, NGFI-B was sufficient for *in vivo* interaction with Brg1 (lane 2) or Brm (lane 4). In presence of Brg1 (lane 3) or Brm (lane 5), GR was co-immunoprecipitated with Flag-NGFI-B, thus showing the *in vivo* dependence on Brg1/Brm for GR recruitment to a trans-repression complex. It thus appears that the requirements for GR/NGFI-B interactions *in vivo* are more stringent than *in vitro* and that Brg1 or Brm may play an essential role as a bridge to stabilize interactions between the two proteins, either directly (Fig. 2.3E and ¹⁰¹) or indirectly.

4.5. BRG1- AND GR-DEPENDENT HDAC2 RECRUITMENT

The formation of a putative trans-repression complex raises the question of how such complex may repress transcription. A first possibility would be that recruitment of GR passively lowers transcription by preventing NGFI-B-dependent activation; alternatively, the Brg1/NGFI-B/GR complex may also recruit co-repressors such as histone deacetylases (HDAC). To test a putative role of HDAC activity in repression of POMC transcription by Gc/GR, we used valproic acid (VPA), an anticonvulsant used in clinical practice, that was reported to be a class I and II HDAC inhibitor and nicotinamide, an inhibitor of NAD-dependent class III HDACs. While nicotinamide had no effect (Fig. 2.5B), VPA treatment prevented Gc repression of POMC promoter activity at low concentration and even reversed the normally Gc-repressed POMC promoter into a Gc-inducible promoter at high VPA concentration (Fig. 2.5A). Similar results were obtained for trichostatin A and sodium butyrate (data not shown). All three HDAC inhibitors share the ability not only to prevent, but to reverse, the sensitivity of POMC transcription to Gc. These results indicate an essential role of histone deacetylases in Gc repression of POMC transcription.

We next assessed the recruitment of different HDACs to the POMC promoter by ChIP (Fig. 2.5C). These experiments clearly indicated recruitment of HDAC2 but not HDAC1 or HDAC3. Further, comparison of cells treated or not with CRH and/or Dex indicated that HDAC2 is only recruited to the promoter in Dex-treated cells (Fig. 2.5D). It is thus possible that HDAC2 is directly associated with GR and Brg1. In order to assess this possibility, we performed co-immunoprecipitation using Flag-tagged HDAC2 (Fig. 2.5E). Whereas HDAC2 was not sufficient for interaction with GR in these experiments (Fig. 2.5E lane 1), it was found that HDAC2 could interact *in vivo* with Brg1 (Fig. 2.5E lane 2) or Brm (Fig. 2.5E lane 4) but most significantly, Brg1 or Brm appeared necessary for co-recruitment of GR with HDAC2 (Fig. 2.5E, lanes 3 and 5).

So far, we have shown in reconstituted systems, co-recruitment of Brg1 with NGFI-B, GR and HDAC2 (Fig. 2.3, 2.4 and 2.5). In order to show similar interactions between endogenous proteins, we used immunoprecipitation in nuclear extract of AtT-20 cells. Immunoprecipitation of GR led to the co-immunoprecipitation of Brg1, HDAC2 and the NGFI-B-related factor, Nurr1 (Fig. 2.5F, lane 3). In previous work, we have shown enhanced activity of NGFI-B and the related nuclear receptors Nurr1 and NOR1 in response to CRH⁵⁷ and we have also shown that GR antagonism is equally exerted on the three Nur-related factors¹²²; we used Nurr1 antibodies in the present experiments because available NGFI-B antibodies are not adequate. In order to test the importance of Brg1 for complex formation, we used siRNAs to knock-down Brg1 (lane 2) and this led to decreased co-immunoprecipitation of Nurr1 and HDAC2 with GR (Fig. 2.5F, lane 4 compared to lane 3).

Since ChIP analyses revealed a preference for HDAC2 in GR repression of POMC, we also assessed HDAC specificity in complex formation. AtT-20 cell nuclear extracts were immunoprecipitated with antibodies against either HDAC1 or HDAC2 and revealed for co-immunoprecipitation of Brg1, GR and Nurr1. As shown in Figure 2.5G, all three proteins were co-immunoprecipitated with HDAC2 (lane 6) but not with HDAC1 (lane 4) in close agreement with promoter recruitment data (Fig. 2.5C). Taken together, these data are consistent with the

idea of trans-repression protein complexes formed in presence in ligand-activated GR: these complexes appear to contain Brg1, GR, Nurr1, and HDAC2. Although we cannot formally exclude the possibility that some of these proteins are present in separate complexes, the recruitment of all these proteins to the POMC promoter in response to cognate signals strongly argues for their joint presence and their association on the promoter.

4.6. TRANS-REPRESSION REDUCES HISTONE ACETYLATION AND PROMOTER CLEARANCE

Previous work had indicated that the effects of CRH and Dex on POMC transcription are essentially transcriptional and they are due to changes in initiation rate^{93,307}. Indeed, the rate of POMC transcription as measured in nuclear run-on assays was decreased by Dex and increased by CRH (Fig. 2.6A). These changes in transcription initiation should be reflected in promoter recruitment of Pol II and this was assessed using ChIP (Fig. 2.6B). Contrary to expectation, Dex inhibition of POMC initiation (Fig. 2.6A) was not paralleled by a decrease in Pol II recruitment at the promoter since promoter occupancy was unchanged by Dex treatment (Fig. 2.6B). As expected, CRH stimulation enhanced Pol II promoter recruitment and this recruitment was reversed by Dex (Fig. 2.6B). It is thus noteworthy that Dex repression has different effects on basal and CRH-stimulated transcription: whereas in both conditions, Dex decreases transcription rates (Fig. 2.6A), only CRH-induced Pol II recruitment is reversed by Dex. This suggests that another mechanism of repression is triggered by Dex and GR, in addition to modulation of Pol II promoter recruitment. The abundance of Pol II over exon 3 sequences was modulated in the same way as transcriptional activity, consistent with a correlation between the number of polymerases over the gene and the level of transcripts (Fig. 2.6A and 2.4B). The discrepancy in Pol II abundance at promoter versus exon 3 in Dex-treated cells suggests reduced promoter clearance by Pol II.

Previous work showed differential Pol II CTD Ser2 and Ser5 phosphorylation on the Gc-repressed NF κ -B-activated IL-8 gene¹¹⁷. We therefore assessed the

presence of Pol II phospho-Ser2 (Fig. 2.6C) and phospho-Ser5 (Fig. 2.6D) forms at the POMC gene and found similar recruitment of both forms of phospho CTD as well as total Pol II at the POMC promoter and exon 3 in basal, stimulated and repressed conditions. This discrepancy likely reflects differences in mechanisms of trans-repression between GR and NGFI-B (present work) which occurs at the level of transcription initiation (Fig. 2.6A) and between GR and NF κ B which occurs at a post-initiation step ¹¹⁸. Indeed, these authors showed a decrease of phospho-Ser2 Pol II at the IL-8 promoter following Dex and this was correlated with reduced elongation rates; in the case of POMC, we did not observe Dex-dependent changes in phospho-Ser2 Pol II at the promoter. In agreement with elongation-dependent increases in phospho-Ser 2 Pol II ³⁰⁸, we found much higher levels of this Pol II form at exon 3 compared to promoter (Fig. 2.6C).

The relative accumulation of Pol II at the POMC promoter in Dex-repressed cells may be due to a sequestering effect of the trans-repression complex; alternatively and not mutually exclusive, it may result from modification of chromatin structure through acetylation since HDAC2 is co-recruited with GR. We therefore assessed the level of acetylated histone H4 over the promoter and exon 3 of the POMC gene using ChIP (Fig. 2.6E). A significant reduction of acetylated H4 was observed over the POMC promoter after Dex repression, in both basal and CRH-stimulated conditions. It is noteworthy that the level of acetylated H4 is not increased by CRH which enhances transcription (Fig. 2.6A) but it should be remembered that constitutive/basal activity of the POMC promoter corresponds to significant transcription and this may be correlated with significant acetylation of the promoter. Similar (but of lesser magnitude) changes in the level of acetylated H4 were observed downstream over exon 3 (Fig. 2.6E). These data are entirely consistent with the recruitment of HDAC2 to the POMC promoter and clearly support a model of trans-repression in which active rather than passive repression is exerted through chromatin modification, together with the possibility that the trans-repression complex itself may contribute to retain Pol II at the promoter or prevent its recruitment in CRH-stimulated condition.

In summary, two complementary mechanisms appear to account for GR trans-repression of the POMC gene. First, recruitment of HDAC2 to the promoter would lead to histone deacetylation and this appears to inhibit promoter clearance in both basal and CRH-stimulated conditions. Second, the CRH-stimulated enhancement of Pol II recruitment to the promoter is prevented under Dex repression, suggesting that further Pol II recruitment is incompatible with the co-recruitment of Brg1, NGFI-B, GR and HDAC2.

4.7. MISEXPRESSION OF BRG1 OR HDAC2 IN CUSHING DISEASE

Pituitary corticotroph adenomas that define Cushing disease³⁰⁹ are typically resistant to Gc feedback and secrete the excessive levels of ACTH that are responsible for the associated hypercortisolism. Gc resistance, or the loss of Gc feedback inhibition, is observed in all Cushing disease patients when assessed by the Dex suppression test. All patients show no response to a low dose of Dex and a subset of patients exhibit a complete resistance to Gc as revealed by challenge with a high dose of Dex. In view of the importance of Brg1 and HDAC2 for Gc repression of POMC transcription, we assessed expression of these proteins in corticotroph adenomas that had been classified as either moderate or complete Gc-resistant in the Dex suppression test (Fig. 2.7M). The Tpit transcription factor is only present in nuclei of corticotroph cells and this factor has been shown to be an excellent marker of corticotroph adenomas³⁰². For many pituitary surgery samples, we had some normal as well as tumor tissue, the later being marked by extensive Tpit-positive nuclei as opposed to dispersed corticotrophs in the normal tissue (Fig. 2.7A). Some tumors did not show any change of either Brg1 (Fig. 2.7B) or HDAC2 (Fig. 2.7C) expression by comparison to normal pituitary. In these tumors as in all normal pituitary samples, Tpit, Brg1 and HDAC2 were found to be exclusively nuclear. A subset of tumors presented with a striking change in the distribution of Brg1 within the tumor but not within the adjacent normal pituitary tissue: indeed, these tumor cells have cytoplasmic, rather than nuclear, localization of Brg1 (Fig. 2.7E). Six tumors of this type were found (Fig. 2.7M) and in each case, tumor expression of HDAC2 was not altered (Fig. 2.7F). Another six tumor samples were found to have

low/undetectable Brg1 (Fig. 2.7H) with normal HDAC2 (Fig. 2.7I), whereas five tumors were found with normal Brg1 (Fig. 2.7K) and no HDAC2 (Fig. 2.7L). None of these tumors had altered GR expression as assessed by immunohistochemistry (data not shown).

Cushing disease is more prevalent in dogs than humans³¹⁰ and we also studied Brg1 and HDAC2 expression in a panel of dog tumors (Supplemental Fig. S2.10). Whereas 4 out of 12 tumors were found to have low or undetectable Brg1 together with normal HDAC2 expression, no dog tumor was found to have cytoplasmic Brg1 or isolated HDAC2 deficiency (Fig. 2.7M). In contrast, we found 2 tumors with both undetectable Brg1 and low HDAC2, an association that was not observed in the panel of human tumors. This may reflect species differences in requirement (or redundancy) for HDAC2.

The compilation of human tumor data according to the level of Gc resistance (Fig. 2.7M) revealed a higher prevalence of cytoplasmic Brg1 in tumors from patients with moderate Gc resistance. Although the number of patients is low, one may speculate that in tumors with abundant cytoplasmic Brg1, there is still enough nuclear Brg1 for a moderate Gc response. Overall, 17 of the 36 human corticotroph adenomas studied (47%) have mis-expression of either Brg1 or HDAC2. Similarly, 6 out of 12 (50%) dog tumors have mis-expression of Brg1 with or without deficient HDAC2. Consistent with the essential roles of Brg1 and HDAC2 for Gc repression of POMC transcription, the loss of nuclear expression of either protein in corticotroph adenomas may account for the associated Gc resistance.

5. DISCUSSION

The present work has revealed a critical role for Brg1 (Fig. 2.1, 2.2) in trans-repression involving GR, NGFI-B and HDAC2. Brg1 is required for *in vivo* recruitment of GR and NGFI-B to the same complex (Fig. 2.4G and 2.5F) and also to bring HDAC2 to GR (Fig. 2.5E). We propose that trans-repression complexes containing Brg1, GR, Nur factors and HDAC2 (Fig. 2.5F,G) would assemble on the POMC promoter (Fig. 2.4C-F and 2.5D) and lead to repression of transcription (Fig. 2.4B and 2.6A) by blockade of Pol II release from the promoter (Fig. 2.6B-D). This active repression may result from histone deacetylation (Fig. 2.6E) and stands in contrast to the CRH-induced increase in POMC transcription (Fig. 2.4B and 2.6A) that occurs through promoter recruitment of Pol II (Fig. 2.6B-D). Thus, Brg1 behaves as a scaffold required to form a ligand- and GR-dependent repression machinery that includes HDAC2 and leads to histone deacetylation and repression by blockade of promoter clearance. The *in vivo* relevance of these proteins was shown in Gc-resistant corticotroph adenomas that characterize Cushing disease (Fig. 2.7).

5.1. ROLE OF BRG1 IN POMC TRANSCRIPTION

Brg1 and Brm, the ATPase subunits of the Swi/Snf chromatin remodeling complexes, have been associated with the control of transcription in many different ways³¹¹. Some genes preferentially recruit Brg1 or Brm, whereas other genes do not show specificity or a need for either proteins³¹². They interact directly with a large array of transcription factors belonging to almost all structural classes of DNA binding proteins. The actions of Brg1 on transcription are thought to occur through chromatin remodeling. Some Brg1-containing complexes also contain HDACs and it may be this association that determines whether activation or repression of transcription takes place³¹³. The existence of HDAC-containing Brg1 complexes does not, however, in itself explain how such complexes are recruited to specific genes.

Transcription of the POMC gene and of NGFI-B-dependent reporters relies in part on Brg1 and this activity appears to be the target of GR trans-repression.

This was suggested by the gain of basal activity in complementation experiments (Fig. 2.1K, L) and by the loss of POMC promoter activity following Brg1 knockdown (Fig. 2.2). We currently do not know how and in particular through which transcription factor(s) Brg1 is recruited to the POMC promoter. There are many candidates for this since it was already shown that Brg1 interacts with NeuroD1³¹⁴, a bHLH factor contributing to cell specificity of POMC transcription³³. We have also detected *in vitro* interaction of Brg1 with Pitx1, but not with the cell-restricted T-box factor Tpit (Fig. 2.3E). The constant presence of Brg1 at the POMC promoter (Fig. 2.4C) together with Pitx1 (Fig. 2.4D) may be taken to argue for *de novo* recruitment to the promoter of Brg1-interacting proteins in response to signals rather than for replacement of complexes; however, it is equally possible that the highly dynamic nature of protein recruitment to promoters³¹⁵ allows for replacement of different Brg1-containing complexes in response to activating or repressing signals.

5.2. BRG1, A SCAFFOLD FOR RECRUITMENT OF GR AND CO-REPRESSORS

Although activation of POMC transcription in response to CRH may be mediated through different regulatory elements and their cognate transcription factors NGFI-B and Tpit^{76,91}, trans-repression by GR specifically requires the NurRE and Nur factors¹²². This strict requirement for Nur factors is a reflection of the specificity of the trans-repression mechanism that relies in some part at least on direct interactions between GR and NGFI-B. Those direct interactions were documented *in vitro*^{121,122} but they appear insufficient *in vivo* to readily allow complex formation between GR and NGFI-B (Fig. 2.4G, lane 1); the *in vivo* requirement on Brg1 (Fig. 2.4G, lanes 3) clearly indicates that additional interactions between GR and Brg1¹⁰¹ and between Brg1 and NGFI-B (Fig. 2.3B) are required in order to form a stable tripartite *in vivo* complex. Thus, Brg1 plays an essential role as scaffold for formation of this complex, and presumably for the *in vivo* recruitment of GR to the promoter (Fig. 2.4E). Although our data clearly argue for an essential role of Brg1, they do not exclude the presence or involvement of other proteins, such as those of the Swi/Snf complex in trans-

repression. Indeed whereas the ATPase activity of Brg1 is required for trans-repression (Fig. 2.3G), an activity that may involve the Swi/Snf complex, this same activity is not required for interaction of Brg1/Brm with GR or NGFI-B (Fig. 2.3B-D). Thus, Brg1 may play its scaffolding role on its own whereas its action in repression depends on chromatin remodeling.

The trans-repression machinery also involves HDAC2 (Fig. 2.5E-G) and since HDAC2 recruitment to the promoter (Fig. 2.5C, D) follows that of GR (Fig. 2.4E), it is likely that GR and HDAC2 are co-recruited. We have observed direct interactions between HDAC2 and GR in pull-down assays (data not shown) but obviously, *in vivo* interactions of HDAC2 with GR require Brg1 or Brm (Fig. 2.5E). Again, these data highlight the essential role played by Brg1 in allowing association of the different proteins that constitute the trans-repression machinery.

5.3. THE TRANS-REPRESSION MACHINERY ACTIVELY REPRESSES TRANSCRIPTION

Taken collectively, our data lead to the proposal of different mechanisms for activation of POMC transcription in response to CRH and for repression as result of GR action (Fig. 2.8). In this model, basal (Fig. 2.8A) and CRH-activated (Fig. 2.8B) transcription is quite similar. This activity is associated with histone H4 acetylation of the promoter and gene (Fig. 2.8A). Stimulation of transcription by CRH leads to recruitment of more NGFI-B to the promoter as well as enhanced recruitment of Pol II (Fig. 2.8B). This enhanced Pol II recruitment is not associated with changes in acetylated histone H4 (Fig. 2.6E), but it results in enhanced transcription initiation (Fig. 2.4B and 2.6A).

Upon ligand (Dex) binding (Fig. 2.8C), GR is recruited to the POMC promoter (Fig. 2.4E) together with HDAC2 (Fig. 2.5D) and recruitment of both proteins to NGFI-B/Nurr1 containing complexes requires Brg1 (Fig. 2.4G and 2.5E-G). Consistent with a model of trans-repression in which GR is recruited to the promoter in part through interactions with NGFI-B^{121,122}, promoter occupancy by NGFI-B is not modified in presence of GR (Fig. 2.4F) and GR promoter

recruitment is even slightly higher in CRH/Dex-treated cells compared to Dex alone (Fig. 2.4E). It is noteworthy that GR recruitment is not associated with a decrease of Pol II occupancy at the promoter, at least in presence of Dex alone (Fig. 2.6B). Thus, the constant amount of Pol II associated with the promoter, presumably in a pre-initiation complex, in the face of less Pol II reaching exon 3 of the gene (Fig. 2.6B) indicates a relative block of Pol II at the promoter in the presence of GR and the trans-repression machinery (Fig. 2.8C). This blockade of Pol II clearance is associated with a repressed transcription initiation rate (Fig. 2.6A) and thus, this appears to be the major consequence of GR action. The hallmark of the action of Dex/GR is recruitment of HDAC2 to the promoter and the resulting decrease in histone acetylation. Promoter recruitment of HDAC activity was shown to be sufficient for inhibition of transcription initiation³¹⁶. Mediation of the repressor effect through HDAC2 recruitment and chromatin remodeling is consistent with the dependence on Brg1 ATPase activity (Fig. 2.3G). In contrast, a model of repression exerted by the trans-repression complex sequestering Pol II through protein interactions would be less likely to depend on the Brg1 ATPase activity, although such interactions may contribute directly or by steric hindrance to limit Pol II recruitment in CRH+Dex conditions (Fig. 2.8D) compared to CRH stimulation (Fig. 2.8B).

5.4. GC RESISTANCE IN CUSHING DISEASE

Hormone resistance is associated with many disease conditions. In some relatively rare cases of steroid hormone resistance, inherited or sporadic mutations of the gene encoding the cognate NR account for hormone insensitivity. More frequently, other and usually poorly defined mechanisms appear to be implicated. These mechanisms may include activation of cross-talk pathways that can alter the activity of NRs through phosphorylation of the receptors themselves or of co-regulatory molecules. In the case of Cushing disease, the development of Gc resistance appears to be an early, if not primary, event for pathogenesis. Indeed, ACTH-producing pituitary tumors are always more resistant to Gc than normal pituitary cells. Only rarely is the Gc resistance

due to GR mutations³⁰³; accordingly, all tumors in our series had normal GR expression (data not shown).

Although there are numerous examples of the implication of Brg1 in NR-dependent transcription³¹², Brg1 has not been implicated previously in hormone resistance. The mislocalization of Brg1 to the cytoplasm may result from aberrant signalling. Alternatively, somatic mutations in Brg1 or HDAC2 may be responsible for altered targeting or loss of expression or function. The corticotroph adenomas being such small and infrequent tumors, it is very difficult to have enough material for biochemical investigation: all tumor sections used in the present study were from archival materials and in some cases, only a few sections were still available. Thus, it is even difficult to undertake extensive genetic analysis of this material. The finding that human tumors were either deficient in Brg1 or HDAC2, but not both, suggests that both proteins are independently essential for Gc repression and that other HDACs cannot compensate for HDAC2 deficiency. This is consistent with our observations in mouse AtT-20 cells where Brg1 and HDAC activity are required (Fig. 2.1, 2.2, 2.5). The situation may be different in dogs since HDAC2 loss was only observed in association with Brg1 deficiency in this species.

5.5. TUMORIGENIC MECHANISMS IN CUSHING DISEASE

The growth of AtT-20 cells is normally inhibited by Gc and relief of this inhibition accelerates their growth³¹⁷. Thus, de-repressed corticotroph growth in the absence of Brg1 may create a hyperplastic state and predispose these cells to tumorigenesis. Loss of Brg1 expression has been observed in other tumors, including lung³¹⁸ and oral³¹⁹ cancers, but it is not known whether this is associated with changes in hormone sensitivity.

Expression of HDACs was found to be either increased or decreased in different cancers. Like for Brg1, no relation with hormone sensitivity has been investigated. It is however noteworthy that HDAC inhibitors appear to have beneficial effects on progression of different tumors³²⁰. The mechanism(s) for this anti-cancer effect is not currently understood and may be multiple as most

HDAC inhibitors lack specificity, lead to genome-wide increases in histone acetylation and to wide scale changes in gene expression. Be that as it may, the possibility that long-term administration of such compounds may impair pituitary Gc feedback and predispose to Cushing disease may have to be considered.

6. MATERIALS AND METHODS

6.1. CELL CULTURE, TRANSFECTION, PLASMIDS

CV-1, C33A, SW13 and MEF TKO cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. A-427 cells were cultured in MEM (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate. CV-1, C33A and MEF TKO were transfected as described^{88,122}. A-427 and SW13 were transfected using 500 ng of reporter plasmid and 0-250 ng of expression vector up to a total of 10 ug per quadruplicate. All cells were stimulated in duplicate for 24hr with dexamethasone 10^{-7} M or vehicle with/without HDAC inhibitors (Sigma) as indicated. NurRE reporter and GRE reporters were described¹²². All transfection data are shown in Figures as means \pm s.e.m. of three experiments each performed in duplicates.

6.2. SMALL HAIRPIN RNA (SHPRNA)

AtT-20 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. They were transfected using 750 ng of POMC reporter plasmid and treated in duplicate for 24 h with dexamethasone 10^{-7} M. Oligonucleotides (63mer) directed against Brg1 or a random sequence were cloned in pTER expression vector³²¹. Co-transfection of 1 μ g CMV-eGFP (Clontech) with 5 μ g of shpRNA plasmid was done using 3×10^6 cells and Lipofectamine (Invitrogen). Cells were then sorted by FACS and 40 000 GFP-positive cells were loaded in each well. For luciferase assay, 0 to 250 ng of shp plasmids were transfected in AtT-20 cells using Lipofectamine (Invitrogen) using 500 ng of POMC reporter plasmid. After SDS-PAGE, Western blots were revealed with antibodies against Brg1 (SNF2 β , Chemicon) and GAPDH (Abcam).

6.3. CO-IMMUNOPRECIPITATION ASSAYS AND WESTERN BLOTS

C33A cells (10 cm-plate) were transfected with 2-20 ug expression plasmids for tagged or native proteins and harvested 48 h later. Cells were harvested in cold PBS, extracted for 30 min at 4°C in TNEN250 with 1 mM PMSF and protease inhibitors. After centrifugation, supernatants were immunoprecipitated at 4°C for

2 h with α Flag M2 (Sigma), and isotype-matched non-immune IgG (Sigma) as control. Immunoprecipitates were washed thrice with TNEN125. After SDS-PAGE, Western blots were revealed with antibodies against Flag M2, HA (SC-805 Santa Cruz), Brg1 (H-88 Santa Cruz), Brm³²², NGFI-B⁷⁷, Nurr1 (N83220 BD Bioscience) and GR (P-20 Santa Cruz). For co-immunoprecipitations in AtT-20 cells, these cells were double-transfected with 50 nM of Brg1 siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) or random siRNA using lipofectamine. Briefly, the cells were transfected for 18 h, trypsinized and re-transfected after 8 h for 48 h. Cells were then stimulated for 30 minutes with CRH and Dex 10^{-7} M before harvest and co-immunoprecipitations performed as above.

6.4. PULL-DOWN ASSAYS

MBP fusion proteins were produced and [³⁵S]-labelled BAF155, Brm and Brg1, were synthesized *in vitro* as described⁸⁹. Labelled proteins were incubated with immobilized MBP-lacZ, MBP-NGFI-B, MBP-Pitx1 or MBP-Tpit in 350 μ l of TNEN50 (50 mM TRIS pH7.5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1% NP-40) with 1 mM PMSF and 2% BSA for 2 h at 4°C. Beads were washed at room temperature twice in TNEN250 and twice in TNEN125. Bound proteins were resolved on SDS-PAGE, stained with Coomassie blue to ensure that similar amounts of fusion proteins were recovered and then autoradiographed.

6.5. CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (CHIP), Q-PCR AND NUCLEAR RUN-ON ASSAYS

AtT-20 cells treated or not for 30 minutes with 10^{-7} M CRH and/or 10^{-7} M dexamethasone, and then were prepared for ChIP as described⁸⁹. Supernatants corresponding to 10^7 cells were subjected to overnight immunoprecipitation at 4°C with antibodies against Brg1^{312,323}, GR (M-20 Santa Cruz), NGFI-B⁷⁷, RNA polymerase II (N-20 Santa Cruz), phospho-Serine2 CTD (MMS-129R Covance), phosphoserine 5 CTD (MMS-134R Covance), HDAC1 (06-720 Upstate), HDAC2 (07-222 Upstate), HDAC3 (06-890 Upstate) and acetyl-histone H4 (06-866 Upstate). Immunoprecipitates were collected with protein A/G agarose beads (Santa Cruz) saturated with tRNA. Quantitative PCR was previously described⁸⁸.

For quantitative RT-QPCR in AtT-20 cells, mRNA was prepared using RNAeasy (Qiagen) and quantitative real-time PCR were done using OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). The nuclear run-on experiments were performed as described⁹³.

6.6. IMMUNOFLUORESCENCE

For α ACTH/Brg1 co-localization, anti-rabbit-Brg1 1:100 (H-88 Santa Cruz) was incubated overnight, anti-mouse-POMC 1:200 (Cortex Biochemicals) and anti-rabbit-biotinylated 1:200 (Vector Laboratories) were added next and finally, anti mouse-fluorescein 1:200 (ImmunoPure Antibody) and avidin-rodhamine 1:200 (Vector Laboratories).

6.7. CLINICAL SAMPLES AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Corticotroph adenomas were selected from archival materials based on the extent clinical investigation prior to surgery, to the availability of data from Dex suppression (Liddle) test and quantity and quality of available tissue sections. Immunohistochemistry was performed as described¹⁵⁰. Antibodies were used as follows: rabbit anti-Tpit 1:25³⁵, rabbit anti-Brg1 1:100 (H-88 Santa Cruz) and rabbit anti-GR 1:250 (M-20 Santa Cruz). All secondary antibodies were used 1:150 (Vector laboratories). HDAC2 was detected with a rabbit anti-HDAC2 1:10 (Upstate No.07-222) and the signal was amplified with the TSATM biotin system (PerkinElmer Life Sciences, Inc).

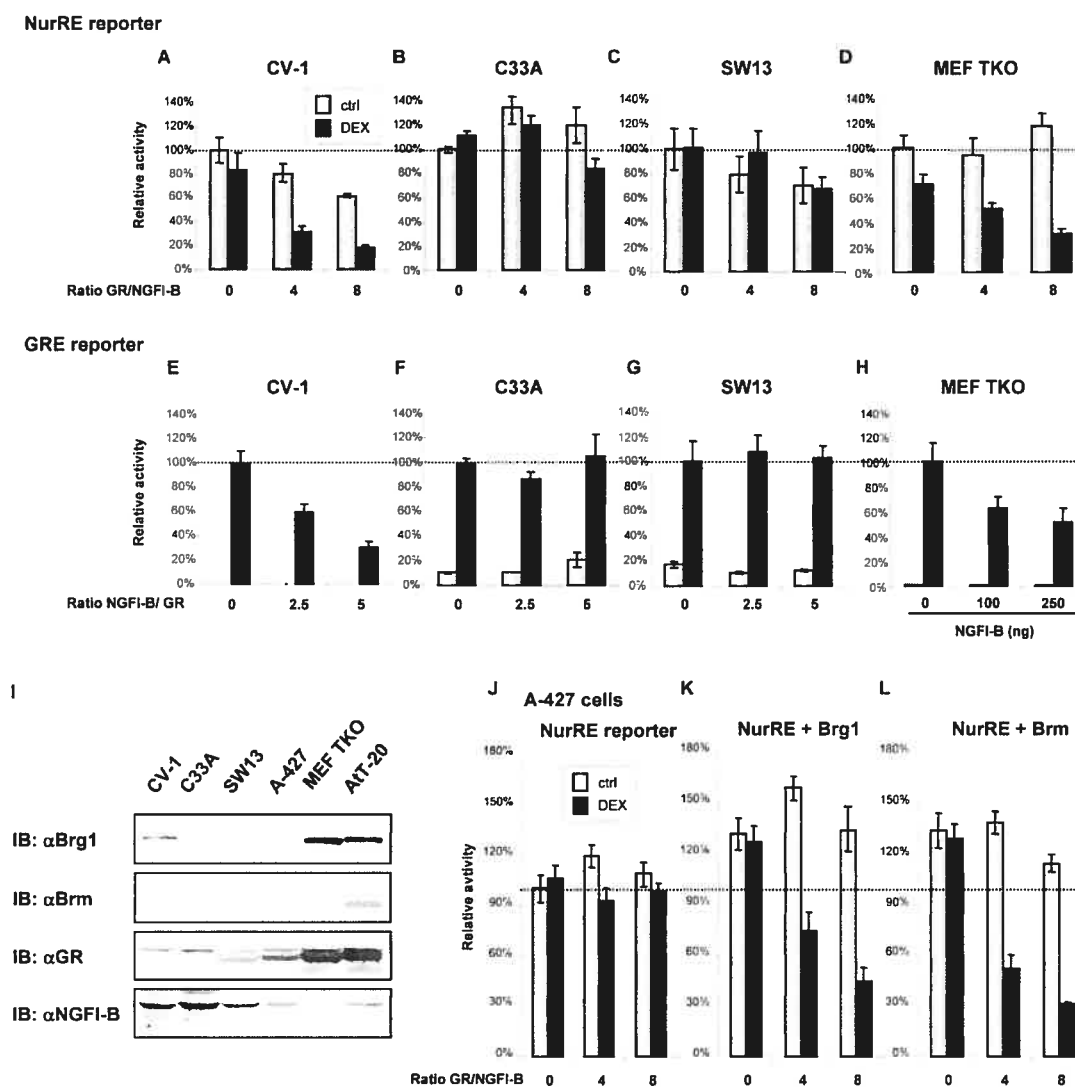


Figure 2.1. Cell lines can/cannot support trans-repression between GR and NGFI-B.

Assessment of trans-repression between GR and NGFI-B using either NurRE (A to D) or GRE (E to H) reporters and expression vectors for NGFI-B (25 ng expression vector in A-D, resulting in 8-10 fold activation) and GR (100 ng expression plasmid in E-H). CV-1 (A, E) and mouse embryonic fibroblasts from *Rb*^{-/-}, *p107*^{-/-} and *p130*^{-/-} mice (MEF TKO) cells (D, H) support trans-repression whereas the Brg1/Brm-deficient C33A (B, F) and SW13 (C, G) cells do not. H) GR is expressed at significant levels in MEF TKO cells and was not overexpressed in these experiments. I) Western blot analysis of cellular proteins showing that the ability for trans-repression correlates with expression of Brg1 or Brm. Whereas GR and NGFI-B are expressed at various levels in all six cell lines, only the trans-repression proficient CV-1, AtT-20 and MEF TKO cells express either Brg1 and/or Brm. J) Brg1/Brm deficient A-427 cells do not support trans-repression which can be reconstituted by expression of Brg1 (K) or Brm (L) as assessed using NurRE reporter and expression vectors for GR and NGFI-B (25 ng expression vector resulting in 8-fold activation). Total DNA is kept constant in all transfections and data represent the means \pm s.e.m. of three experiments, each performed in duplicates.

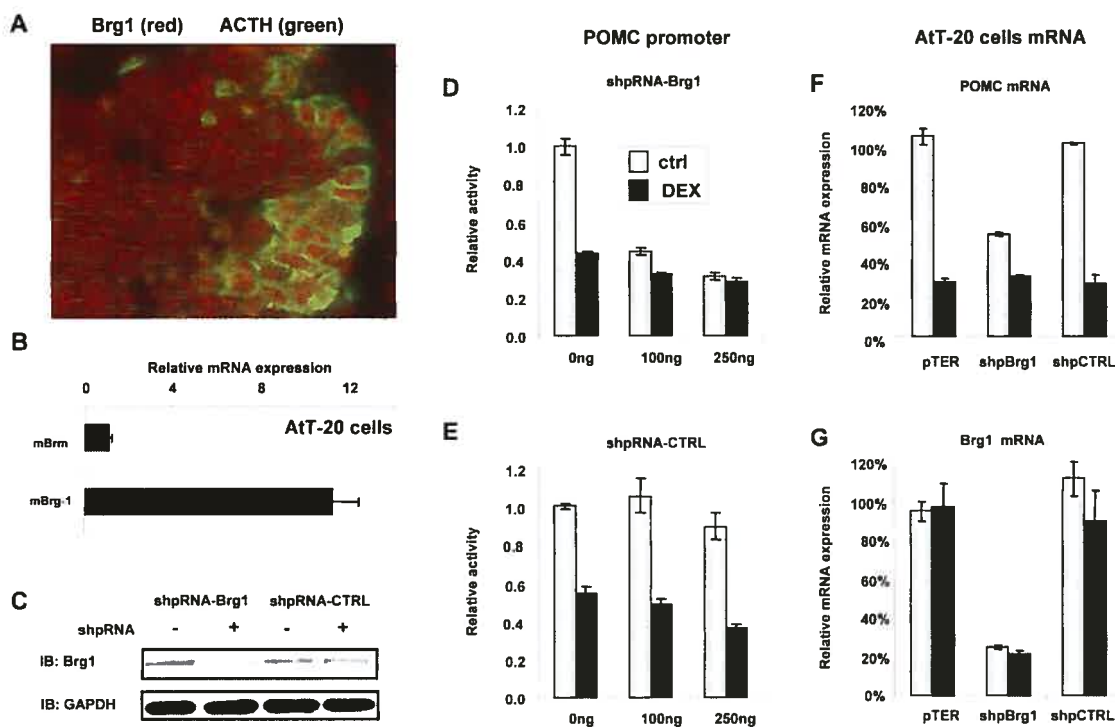


Figure 2.2. Brg1 is required for POMC promoter activity and trans-repression by GR.

A) Colocalization of Brg1 (red) with the corticotroph marker ACTH (green) in mouse pituitary section. B) Relative mRNA expression (RT-QPCR) of Brg1 and Brm in corticotroph AtT-20 cells showing a preponderance of Brg1. C) Western blot analysis of Brg1 expression in AtT20 cells transfected with expression plasmids for Brg1 or control shpRNA; GAPDH was measured as loading control. D, E) Effects of Brg1 (D) or control (E) shpRNA knockdown on the activity (ctrl) and glucocorticoid (Dex) repression of a POMC promoter luciferase reporter assessed in transfected AtT-20 cells. F, G) Effects of the same shpRNAs on endogenous POMC (F) and Brg1 (G) mRNAs in transfected and FACS sorted AtT-20 cells. Endogenous mRNAs were quantitated by RT-QPCR. Data of three experiments each performed in duplicates are shown as means \pm s.e.m.

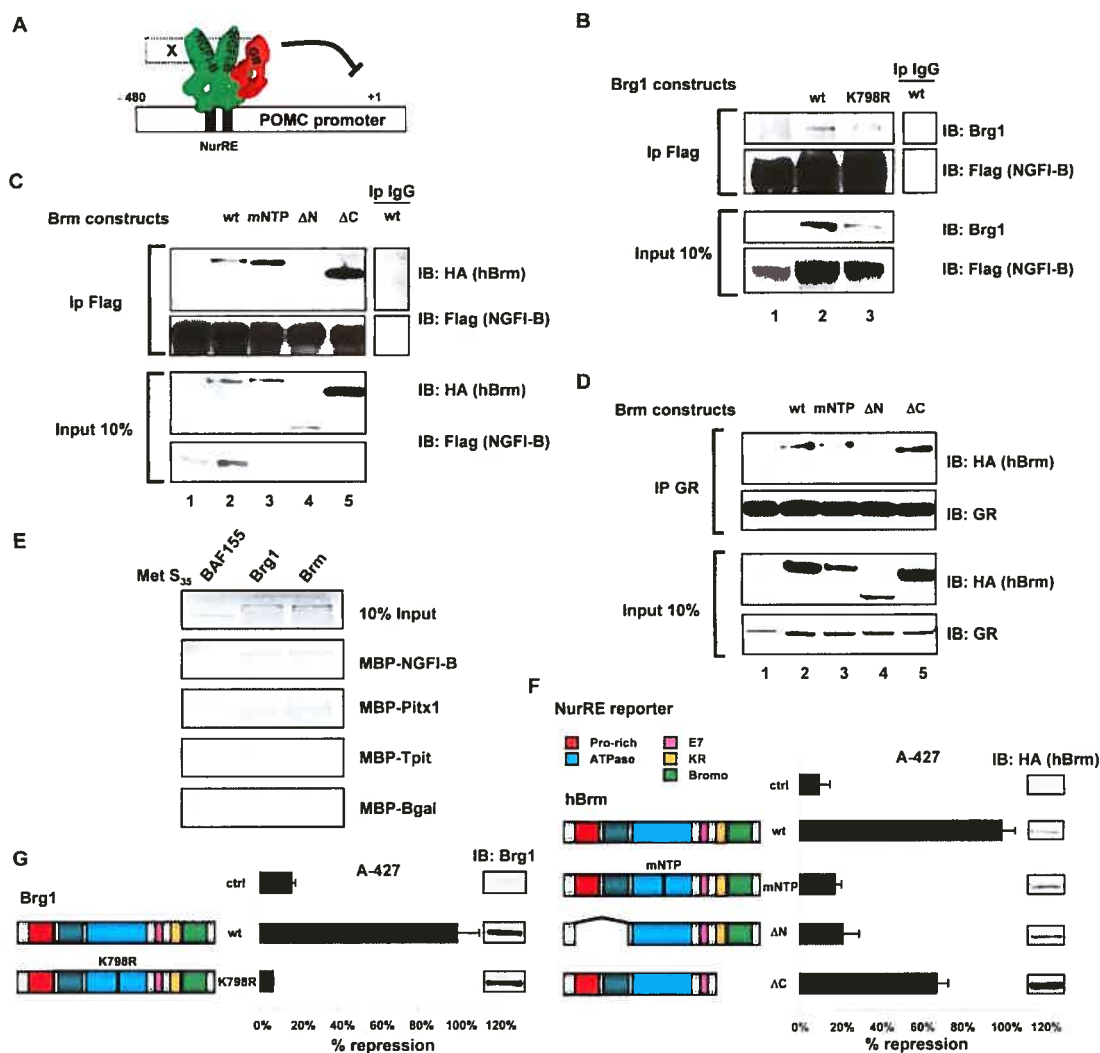


Figure 2.3. Brg1 and Brm ATPase activity is required for repression but not for interaction with NGFI-B or GR.

A) Standard model of trans-repression by GR. On the POMC promoter, dimers of NGFI-B or heterodimers between NGFI-B and the related orphan nuclear receptors Nurr1 and NOR1 bind the NurRE; their activity is enhanced by CRH signaling. Glucocorticoid repression is thought to be initiated through protein:protein interactions between GR and promoter-bound NGFI-B. B) Co-immunoprecipitation of Brg1 or its ATPase-deficient K798R mutant with Flag-tagged NGFI-B. GR and Brg1-deficient C33A cells were transfected with expression vectors as indicated and relevant proteins were revealed by immunoblotting (IB) after immunoprecipitation (IP) of Flag-NGFI-B. C) Co-immunoprecipitation of Brm or its indicated mutants following immunoprecipitation of Flag-NGFI-B. D) Co-immunoprecipitation of Brm or its indicated mutants following immunoprecipitation of GR. E) *In vitro* pulldown of S^{35} -labelled Brg1 or Brm with MBP-NGFI-B, MBP-Pitx1, MBP-Tpit or MBP- β Gal as control. The Swi/Snf protein BAF155 was used as control. F, G) Reconstitution of trans-repression using a NurRE reporter in A-427 cells with hBrm and mutants of this protein (F) as well as with Brg1 and the ATPase deficiency Brg1 mutant K798R (G). Band reporter activity was similar for all Brg1 and Brm proteins. The relative expression levels of each Brm or Brg1 protein was assessed by Western blot (insets). Data represent the means \pm s.e.m. of three experiments, each performed in duplicates.

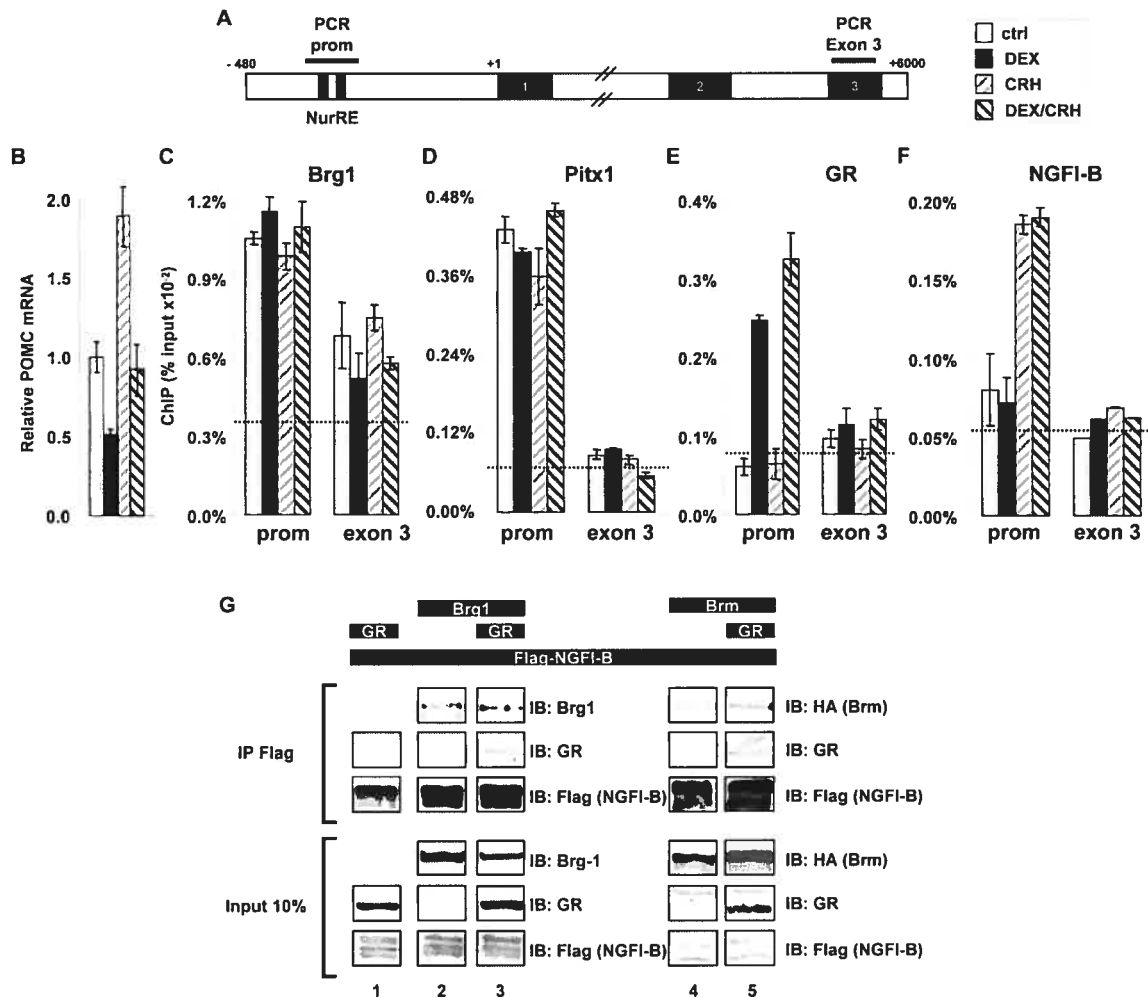


Figure 2.4. Brg1 is required for complex formation between NGFI-B and GR.

A) Schematic representation of the mouse POMC gene indicating the position of PCR amplified regions in chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. B) Abundance of POMC mRNA measured by RT-QPCR in control and AtT-20 cells treated as indicated. Both the synthetic glucocorticoid dexamethasone (Dex) and the hypothalamic hormone CRH were used at 10^{-7} M. C) ChIP analysis of Brg1 recruitment at the POMC promoter and exon 3 of the POMC gene in AtT-20 cells. The dashed line indicates background ChIP signal observed with control IgG. D) ChIP analysis of Pitx1 recruitment to the POMC promoter and exon 3. E) ChIP analysis of GR recruitment to the POMC promoter and exon 3. F) ChIP analysis of NGFI-B recruitment to the POMC promoter and exon 3. G) Co-immunoprecipitation of GR requires Brg1 or Brm with Flag-NGFI-B in co-transfected C33A cells.

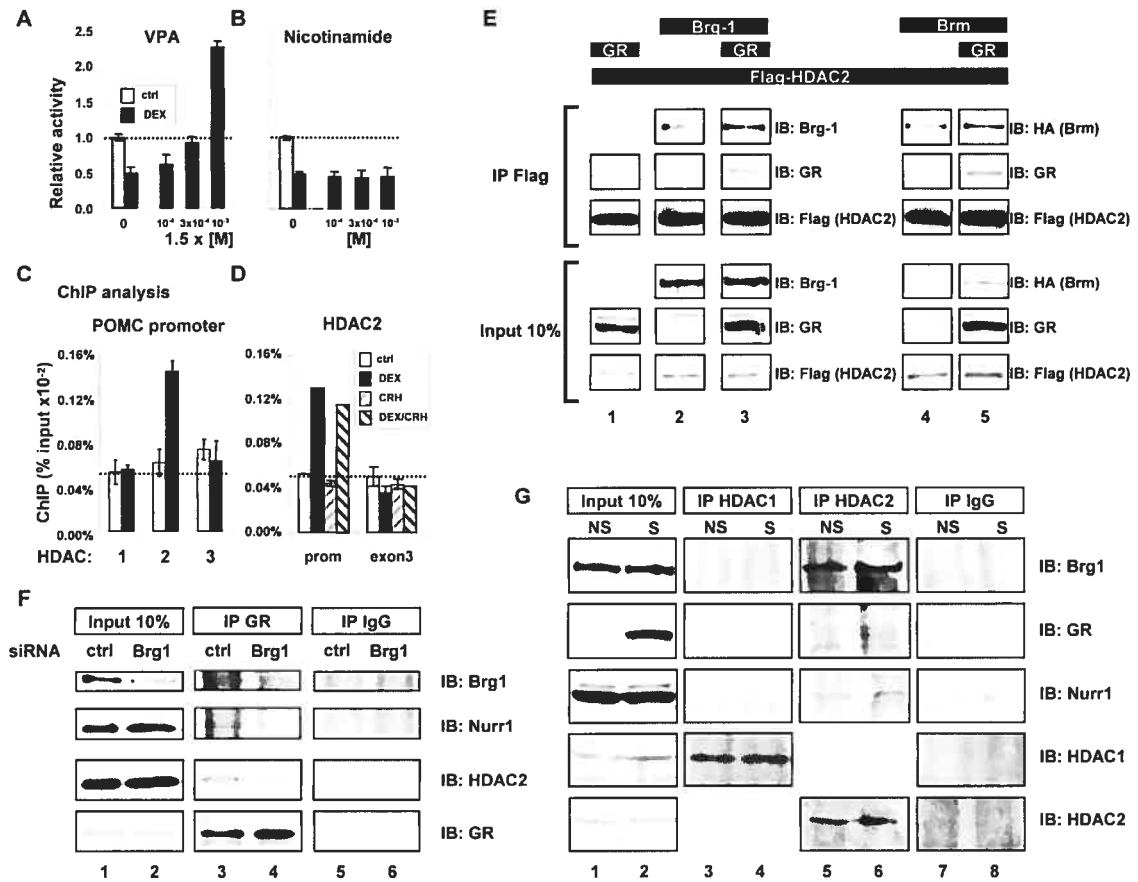


Figure 2.5. Brg1-dependent recruitment of HDAC2 to trans-repression complex.

AtT-20 cells were treated with A) valproate (VPA) or B) nicotinamide at the indicated concentrations and assessed for Dex repression of POMC-luciferase activity. Class I and II (A), but not class III (B), HDAC inhibitors show a complete loss of Dex repression. C) ChIP analysis of POMC promoter showing Dex-dependent recruitment of HDAC2 to the promoter, but not HDAC1 or 3. D) ChIP analysis of HDAC2 recruitment to the POMC promoter, but not to POMC exon 3, following treatment of AtT-20 cells with Dex. E) Co-immunoprecipitation of GR with Flag-HDAC2 requires the presence of Brg1 or Brm in transfected C33A cells. F) Co-immunoprecipitation of Brg1, the Nur related factor Nurr1 and HDAC2 with endogenous GR in AtT-20 cell nuclear extracts (lane 3) is impaired following siRNA knockdown (lane 2) of Brg1 (lane 4). G) Co-immunoprecipitation of endogenous Brg1, GR and Nurr1 in AtT-20 cells stimulated (S) or not (NS) with CRH and Dex following HDAC2 immunoprecipitation. Neither immunoprecipitation with antibody against HDAC1 or control IgG brought down these proteins.

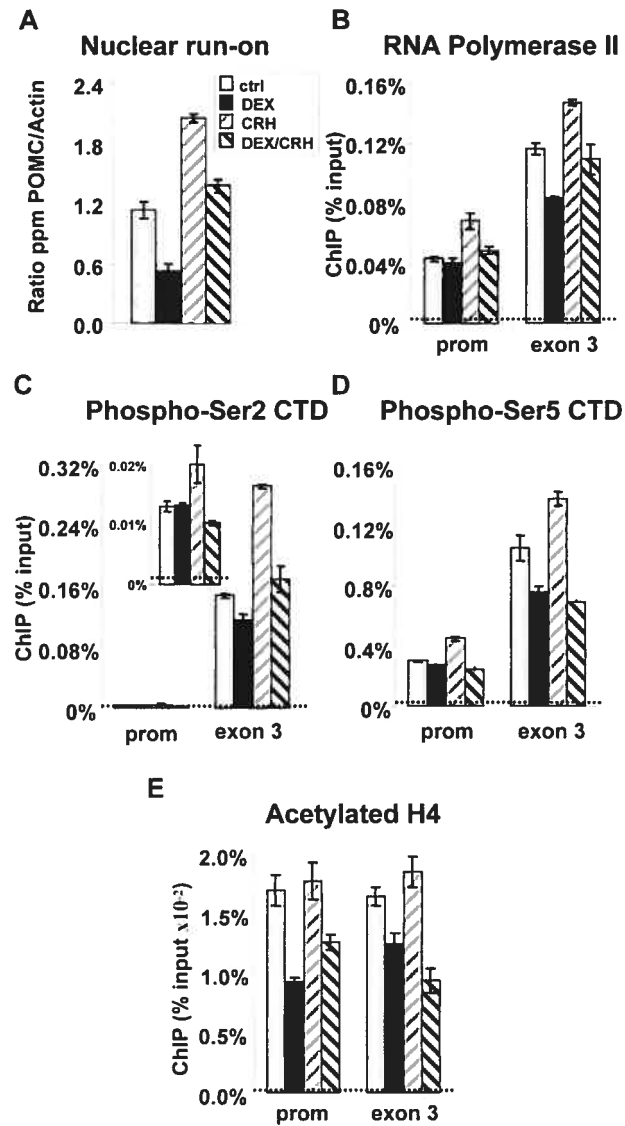


Figure 2.6. POMC promoter function in repressed (Dex) and activated (CRH) conditions.

A) Initiation of POMC transcription as measured in nuclear run-on assays in pituitary primary culture treated with Dex and/or CRH. B) ChIP analyses of RNA Pol II recruitment to the POMC promoter and exon 3 in control and treated AtT-20 cells. C) ChIP analysis of POMC gene occupancy by Pol II with phospho-Ser2 CTD. D) ChIP analysis of POMC gene occupancy by Pol II with phospho-Ser5 CTD. E) ChIP analysis of acetylated histone H4 over the POMC promoter and exon 3. Dashed lines indicate background ChIP signals.

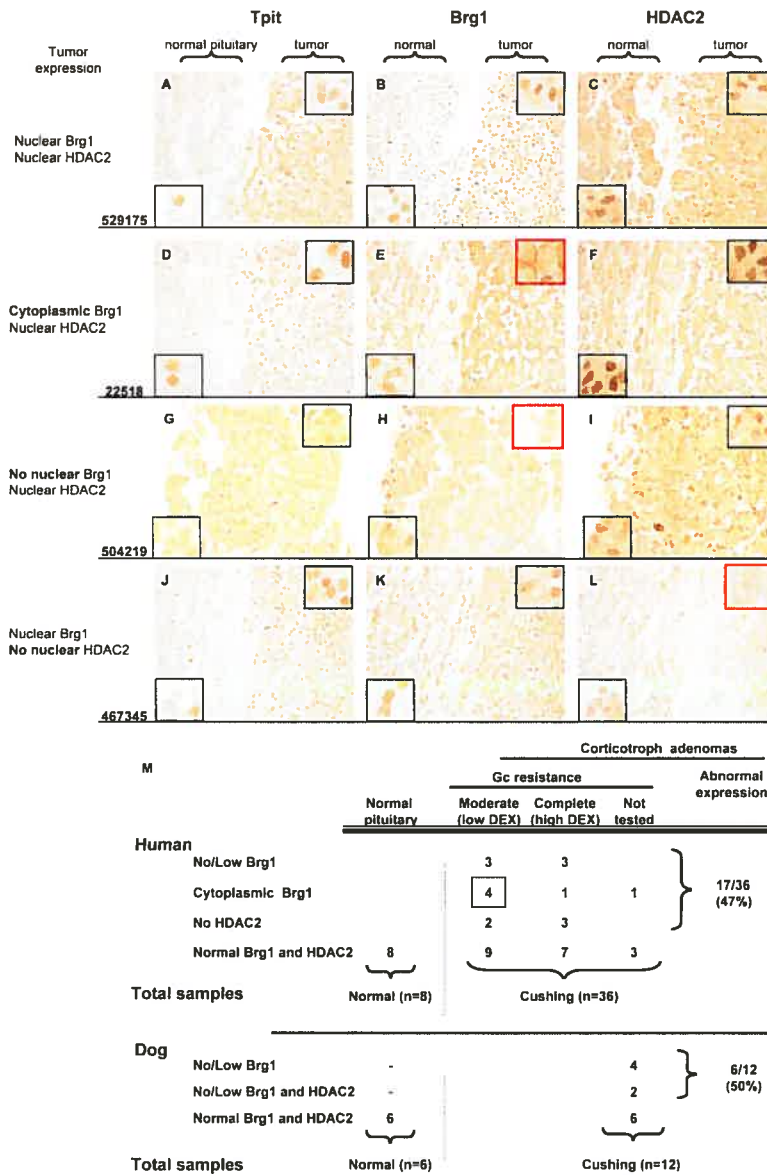


Figure 2.7. Deficient Brg1 or HDAC2 expression in Cushing disease corticotroph adenomas.

Immunohistochemical analysis of the corticotroph marker TPIT (A, D, G, J), Brg1 (B, E, H, K) and HDAC2 (C, F, I, L) in representative corticotroph adenomas. (A to C) Tumor revealed by nuclear TPIT staining (A) with normal nuclear Brg1 (B) and nuclear HDAC2 (C). (D to F) Tumor with cytoplasmic Brg1 (E) and normal nuclear HDAC2 (F). Note nuclear Brg1 in contiguous normal tissue. (G to I) Tumor with no nuclear Brg1 (H) and normal nuclear HDAC2 (I). (J to L) Tumor with normal nuclear Brg1 (K) and no nuclear HDAC2 (L). Each row presents data from one patient which is representative of the others in the same group as summarized in (M). Human patients were subdivided into moderate or complete Gc resistance group depending on their response to low or high doses of dexamethasone. In 19 cases, expression of Brg1 and HDAC2 were similar in tumor and normal pituitary tissues. Overall, 17 of 36 patients (47%) present with abnormal expression of Brg1 or HDAC2. The panel of 12 dog corticotroph adenomas (supplemental Fig. S2.10) had 4 with no/low Brg1 expression and 2 with no tumor Brg1 and low HDAC2.

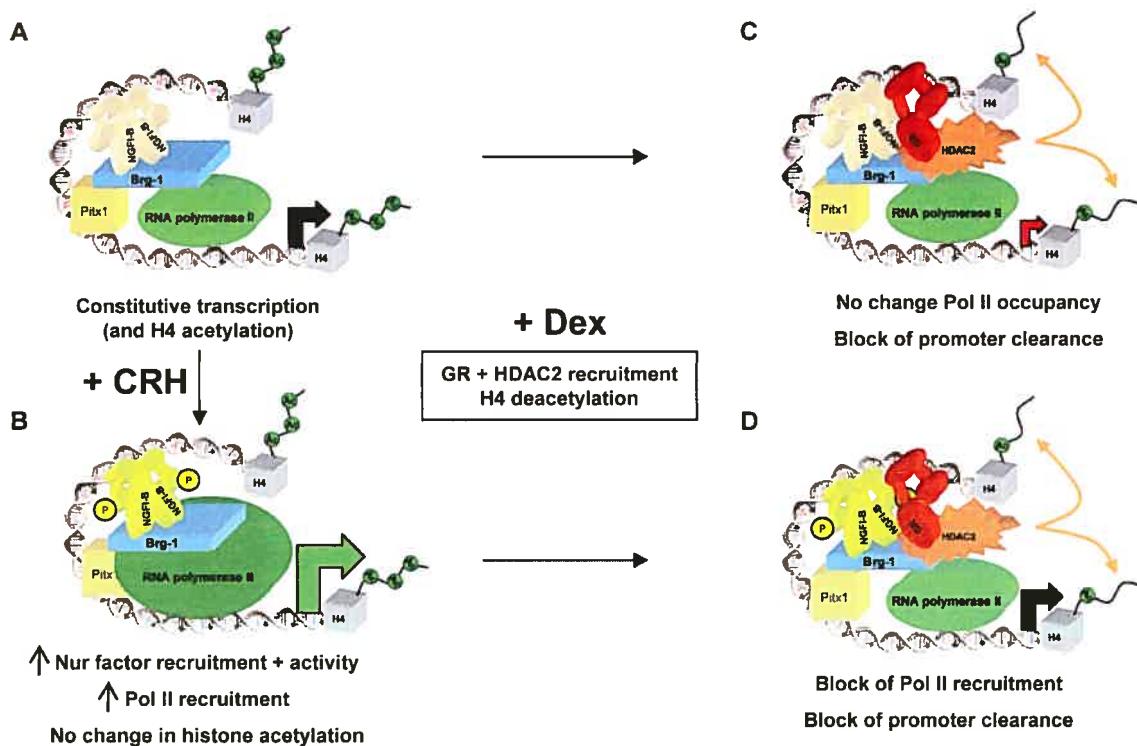


Figure 2.8. Model of Brg1-dependent trans-repression.

A) The pituitary POMC gene is constitutively expressed in corticotroph cells. This basal transcription relies on many ubiquitous and cell-restricted factors such as Pitx1, Tpit and NeuroD1 (not shown) and on signal-regulated factors such as NGFI-B. This activity is partly dependent on Brg1 and is reflected by the presence of RNA Pol II at the promoter and by the presence of acetylated histone H4 over the promoter and gene. For the sake of clarity, nucleosomes are not shown in these diagrams and histones H4 which are always within nucleosomes, are portrayed as isolated entities in the promoter and gene regions. B) CRH activation through the PKA and MAPK pathways enhances NGFI-B activity through phosphorylation of its AF-1 domain and its recruitment to the promoter. This leads to increased Pol II at the promoter and increased transcription initiation without changes in H4 acetylation. C) Ligand (Dex) activation of GR initiates formation of a Brg1-dependent protein complex that also contains NGFI-B and HDAC2. Both GR and HDAC2 are recruited to the promoter with neither contacting DNA directly. This results in de-acetylation of H4 and inhibition of transcription initiation without changing promoter occupancy of Pol II: promoter clearance thus appears to be reduced. D) Trans-repression of transcription initiation by GR is dominant over CRH activation as GR and HDAC2 are still recruited in presence of both regulators and H4 are de-acetylated. Presence of the trans-repression complex containing Brg1, NGFI-B, GR and HDAC2 may prevent promoter recruitment of Pol II by steric hindrance or through protein interactions.

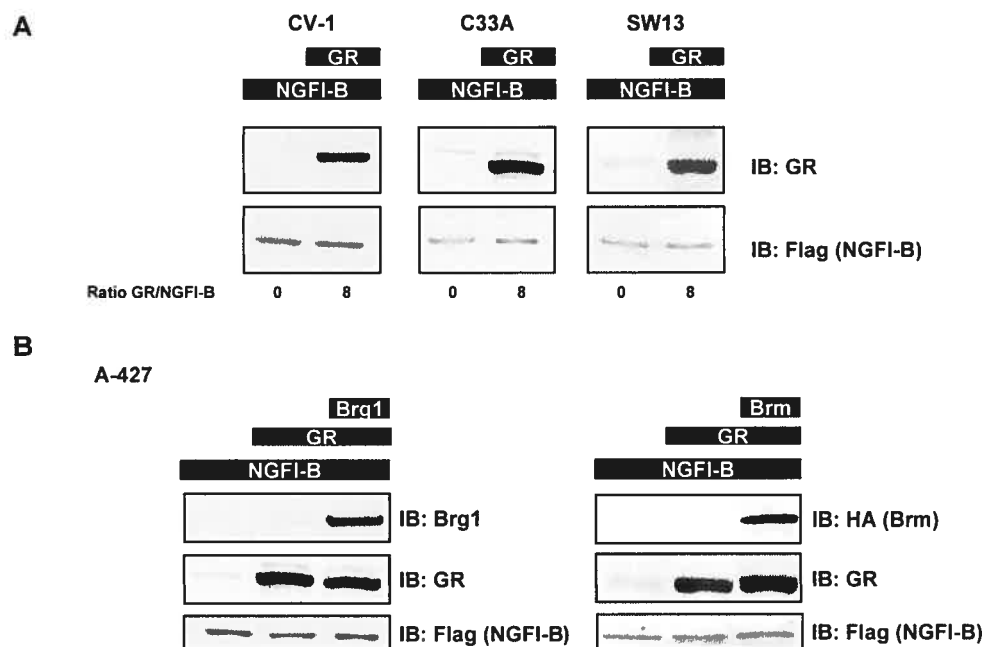


Figure S2.9. Assessment of protein expression in transfections experiments.

A) Western blot analysis of GR and Flag-NGFI-B expression following co-transfection of expression plasmid in CV-1, C33A and SW13 cells as indicated. B) Similar Western blot analyses were conducted in A-427 cells in which trans-repression is rescued by expression of Brg1 or Brm.

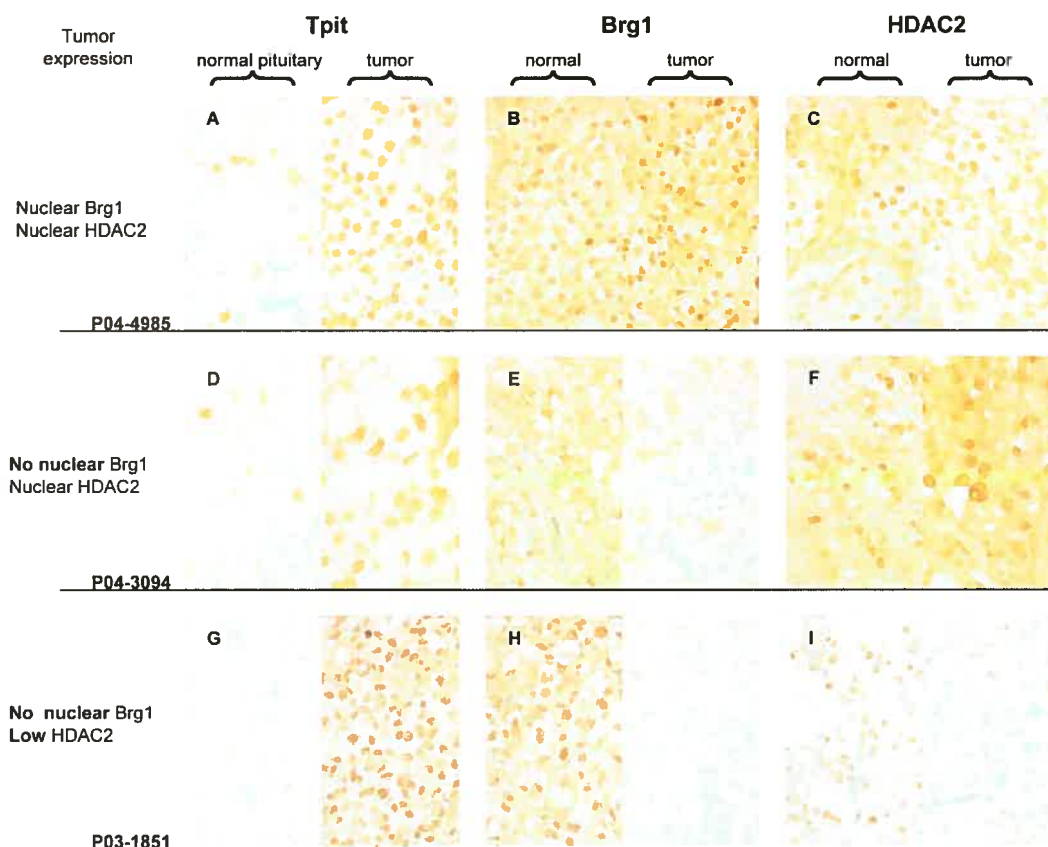


Figure S2.10. Deficient Brg1 and HDAC2 expression in dog pituitary corticotroph adenomas.

Immunohistochemical analysis of the corticotroph marker TPIT (A, D, G), Brg1 (B, E, H) and HDAC2 (C, F, I) in dog corticotroph adenomas. (A to C) Dog tumor with normal nuclear Brg1 (B) and nuclear HDAC2 (C) expression. (D to F) Dog tumor with low/no nuclear Brg1 (E) and normal nuclear HDAC2 (F). (G to I) Dog tumor with no nuclear Brg1 (H) and low nuclear HDAC2 (I). Each row presents data from one dog which is representative of the others in the same group as summarized in Figure 7M.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to many colleagues from the lab for comments on this work and manuscript, and in particular, we thank François Robert, Luc Gaudreau and Jacques Côté for helpful comments. We thank Jean-Pierre Gagner for sharing his experience in nuclear run-on assays. We thank Moshe Yaniv and Christian Muchardt for Brm expression plasmids and antibodies, Weidang Wang for Brg1 expression plasmid and antibody and Julien Sage for MEF TKO cells. We thank Hans Clevers for the pTER expression plasmids. The expert secretarial assistance of Lise Laroche was greatly appreciated. This grant was supported by fellowship from Fonds des chercheurs et aide à la recherche-Fonds de la recherche en santé du Québec (FCAR-FRSQ) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to SB, and by research grants to JD from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and National Cancer Institute of Canada (NCIC).

CHAPITRE 3 : LOSS OF P57^{KIP2} UNCOUPLES PROLIFERATION FROM DIFFERENTIATION IN PITUITARY DEVELOPMENT

Steve Bilodeau¹, Audrey Roussel-Gervais¹, Jacques Drouin^{1‡}

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

Keywords: proliferation; cyclins; p27; pituitary; POMC; Tpit

‡To whom correspondence should be addressed:

Jacques Drouin
Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)
110, avenue des Pins Ouest
Montréal QC Canada H2W 1R7
Tel: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575
j.drouin@ircm.qc.ca

1. AVANT-PROPOS

Le développement normal et la tumorigénèse sont deux processus intimement liés puisqu'ils dépendent du contrôle du cycle cellulaire. L'hypophyse est un organe extrêmement sensible au développement spontané de tumeurs chez l'homme et dans divers modèles de souris invalidés pour des régulateurs du cycle cellulaire. Avant de s'attaquer à la question spécifique du développement des tumeurs corticotropes, cette étude relate les différentes étapes nécessaires pour l'établissement des lignées hypophysaires d'un point de vue du cycle cellulaire.

L'équilibre entre la prolifération et la différenciation est à la base du contrôle de l'organogénèse chez les mammifères. D'une manière générale, il est cru que ce sont les signaux de différenciation qui forcent la cellule précurseur à sortir du cycle cellulaire et à entrer en différenciation. Le présent chapitre démontre que le contrôle de la sortie du cycle cellulaire est indépendant des signaux de différenciation.

Nos résultats montrent qu'au niveau hypophysaire, il existe plusieurs populations distinctes de cellules : les progéniteurs prolifératifs, les précurseurs non-prolifératifs et les cellules différenciées. La sortie du cycle cellulaire est dépendante de $p57^{Kip2}$. En son absence, l'hypophyse devient hyperplasique suite à une surprolifération des progéniteurs non-différenciés, mais la différenciation n'est pas affectée. À l'inverse, un blocage de la différenciation par l'inactivation du gène *Tpit*, qui est exprimé dans les cellules corticotropes et mélanotropes, provoque l'accumulation des cellules au stade $p57^{Kip2}$ non-différencié. La présente étude révèle un nouveau paradigme pour expliquer les mécanismes impliqués dans la transition entre prolifération et différenciation lors du développement.

2. SUMMARY

It is often believed that patterning and differentiation signals drive the developmental program including cell cycle exit of proliferating progenitors. Taking advantage of the spatial and temporal separation of proliferating and differentiated cells within the developing anterior pituitary gland, we report the identification of a population of non-cycling precursor cells that are marked by expression of the cell cycle inhibitor p57^{Kip2} and cyclin E. In p57^{Kip2}^{-/-} mice, the developing pituitary is hyperplastic due to accumulation of proliferating progenitors whereas pituitary overexpression of p57^{Kip2} leads to hypoplasia. p57^{Kip2}-dependent cell cycle exit is not required for cell differentiation and conversely, blockade of cell differentiation as achieved in Tpit^{-/-} pituitaries does not prevent cell cycle exit but rather leads to accumulation of p57^{Kip2}-positive precursors. These data indicate that during normal development, cell cycle exit is controlled independently of differentiation.

3. INTRODUCTION

The cell cycle is a highly controlled process that integrates numerous signals involved in normal cell proliferation and tumorigenesis. Every step of the cell cycle is subject to regulation and critical regulators of this process include the cyclins and cyclin-dependent kinases (cdk). Most of our understanding of mechanisms controlling cell cycle progression comes from studies in cultured cells. But the precise role of cell cycle regulators in normal development is not fully understood: this is best exemplified by the relatively subtle phenotypes of many mouse mutants deficient for regulators thought to be critical for cell cycle progression based on cell culture studies [reviewed in ²⁰²].

Progression through the cell cycle is controlled by pairs of cyclins and cdk's. In cycling cells, progression through the G1 phase is dependent on the cyclin D/cdk4/6 complexes whereas cyclin E/cdk2 are required for the G1/S transition and cyclin A/B together with cdk1 (cdc2) are required for G2/M progression ²⁰³. This process is also under the control of negative regulators, the cyclin-dependent kinase inhibitors (cdki). These inhibitors are divided in two groups: the INK4 and Cip/Kip families ²⁰⁴. The INK4 family encodes inhibitors of cyclin D/cdk4/6 complexes and includes p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} and p19^{INK4d}. The Cip/Kip family consists of p21^{Cip1}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2}.

Organogenesis can be simplistically viewed as a combination of patterning cues acting on differentially proliferating tissues and thus the shape of organs/tissues is intimately dependent on cell cycle control and in particular, on cell cycle exit of proliferating progenitors. The cell-cycle inhibitors appear to have critical roles in timing cell cycle exit prior to differentiation. For example, ablation of p57^{Kip2}, the less studied Cdk1, caused severe developmental abnormalities characterized by global organomegaly ^{249,254}. Furthermore, double knockout mice for p27^{Kip1} and p57^{Kip2} have defective cell cycle exit and differentiation of lens fiber cells ^{255,256}. Muscle differentiation and inner ear development are also regulated by cdk1 ^{258,324,325}. Such studies highlighted the importance of cell cycle exit for proper development and suggested a close link with differentiation. However, we

currently have limited insight into the developmental program that drives proliferating progenitors out of the cell cycle and into the differentiation process. The present study investigates the relationship between these two processes in the developing pituitary gland.

The pituitary has been a useful model to understand the role of cell cycle regulators in tumorigenesis. Indeed, the pituitary is particularly sensitive to the loss of function for many cell cycle regulators, including p18^{INK4c}, p27^{Kip1} and Rb^{90,238-240,266}. In contrast to the wealth of information on implication of Cdkis in pituitary tumor formation, less is known on their contribution to pituitary organogenesis and cell differentiation. The pituitary develops from an invagination of the oral ectoderm known as Rathke's pouch. The epithelial fold that constitutes Rathke's pouch at e9.5/e10.5 separates from the oral ectoderm and organogenesis proceeds as cells leave this epithelium to form a nascent anterior pituitary lobe. This early phase of pituitary organogenesis occurs between e11.5 and e13.5 and it is associated with extensive cell proliferation¹⁷². A number of transcription factors have been shown to be critical for this early phase of organogenesis and cell proliferation. They include the Pitx1/Pitx2^{162,326} and Lhx3/4¹⁶⁵.

The proliferation of early pituitary progenitors is followed closely by sequential differentiation of various postmitotic hormone-producing cells. The adult rodent pituitary is composed of three different lobes: the posterior lobe is made of axonal projections coming from the hypothalamus whereas the intermediate lobe (IL) only contains pro-opiomelanocortin (POMC) -expressing melanotroph cells. The anterior lobe (AL) contains five lineages that appear sequentially: POMC-expressing corticotrophs (ACTH-secreting), thyrotrophs (TSH), somatotrophs (growth hormone, GH), lactotrophs (prolactin, PRL) and finally, gonadotrophs producing the gonadotropins LH and FSH. Cell-restricted transcription factors are essential for hormone gene transcription and cell differentiation. These include the T-box factor Tpit required for corticotrophs and melanotrophs^{35,197,198}, SF1 and GATA-2 for gonadotrophs^{189,194,195}, and Prop-1 and Pit1 for somatotrophs and lactotrophs^{168,183}.

In the present work, expression pattern analyses for cell cycle regulators and differentiation markers during early pituitary development led to the identification of spatially- and temporally-restricted non-cycling precursor cells characterized by expression of p57^{Kip2} and cyclin E. In differentiated cells, p57^{Kip2} is replaced by p27^{Kip1}. Analysis of pituitaries from p57^{Kip2}^{-/-} and p57^{Kip2} gain-of-function mice suggest that the role of p57^{Kip2} in normal pituitary development is to exit proliferating progenitors from the cell cycle without affecting cell differentiation. p57^{Kip2}-positive non-cycling precursors are maintained throughout adulthood in mice that are defective in differentiation such as in Tpit^{-/-} mice. These studies indicate that cell cycle exit and differentiation are uncoupled and sequential during normal development. Although the pituitary offered the opportunity to identify the transient population of non-cycling precursors, this work suggests a more widely relevant paradigm for development in many tissues.

4. RESULTS

4.1. DELAY BETWEEN CELL CYCLE EXIT AND PITUITARY DIFFERENTIATION

To start addressing the molecular basis of the particular sensitivity of the mouse pituitary to tumorigenesis³²⁷, we followed expression of cell cycle regulators as pituitary cells progress from proliferative progenitors to differentiated cells. Proliferative cells were marked by BrdU incorporation and mitotic cells were identified by phospho-histone H3 (pHH3) immunofluorescence; differentiated cells are revealed by hormones or cell-specific transcription factor expression. At e11.5 and e12.5, the developing pituitary does not contain differentiated cells³⁵ and has a large number of proliferative cells as revealed by BrdU and phospho-H3 labeling (Fig. 3.1A-B). At e13.5, BrdU and phospho-H3-positive cells are mostly found around the lumen of the developing gland. Within the developing AL, BrdU-positive proliferating cells become concentrated on the dorsal side (Fig. 3.1C) whereas the first differentiated cells appear on the ventral side (Fig. 3.1F) as Tpit-positive corticotrophs³⁵. There are much fewer BrdU- and pHH3-positive cells by e14.5 or e16.5 (Fig. 3.1D, E) and the adult gland has just a few such cells per section (data not shown). The position of proliferating (dorsal) and differentiated (ventral) cells in the developing AL is represented schematically in Figure 3.1G; at these early stages, they are separated by cells that appear to be neither.

4.2. P57^{KIP2} AND CYCLIN E EXPRESSION MARK A NON-CYCLING UNDIFFERENTIATED CELL POPULATION

The AL cell population that is neither proliferating nor differentiated was investigated for expression of various cell cycle regulators. It was found that cyclin E is particularly expressed in these cells (Fig. 3.2A) but not cyclins D1 or D2 (Fig. 3.2B, C). Expression of cyclins D1 and D2 in proliferating cells was expected. Cyclin E is reported to be expressed at the G1 to S transition²⁰³, but surprisingly, cyclin E-positive cells of the developing pituitary do not include any BrdU-positive cells (Fig. 3.2A). The Cip/Kip family of cyclin-dependent kinase

inhibitors have been associated with cell cycle exit²⁰³. Since p57^{Kip2} (CDKN1C) was shown to be expressed particularly strongly during early pituitary development²⁶⁰ and its knockout results in organomegaly²⁴⁹, we investigated its expression in developing pituitaries. We performed co-labeling of p57^{Kip2} and BrdU (Fig. 3.2D): p57^{Kip2}-positive cells were never found to be BrdU-positive (Fig. 3.3G). In order to ascertain that p57^{Kip2}-positive AL cells are indeed non-cycling, we also did co-labeling of p57^{Kip2} with cyclin D2. Mostly single positive cells for p57^{Kip2} were observed in the AL although there are a few cyclin D2/ p57^{Kip2}-double positive cells (Fig. 3.2E). The similar distribution of p57^{Kip2}- and cyclin E-positive cells suggest that they may overlap: indeed, p57^{Kip2} is co-expressed with cyclin E in most AL non-cycling cells (Fig. 3.2G-I and 3.3G, H). The central location of p57^{Kip2} and cyclin E-positive cells in the e13.5 developing AL suggests that these cells may represent an intermediate population between proliferating and differentiated cells.

In order to show that p57^{Kip2} and cyclin E double-positive cells are neither proliferating nor differentiated, we used a mixture of antibodies against BrdU, pHH3, ACTH and α GSU that respectively label proliferating and differentiated cells. These experiments showed that p57^{Kip2}-positive cells are not proliferating and almost never differentiated (Fig. 3.2J, L and 3.3G) and similarly for cyclin E (Fig. 3.2M-O and 3.3H). Taken collectively, these data indicate that the centrally-located (Fig. 3.2F) p57^{Kip2} and cyclin E double-positive cells are non-cycling and undifferentiated; their localization suggests that these cells may be non-cycling precursors that have exited the cell cycle and are waiting for differentiation cues.

Throughout the above description, we have not discussed the developing IL that sits across the lumen opposite the AL. Although the IL appears to contain similar cells as those described in the AL, their intermingling in space and time does not permit conclusions about separate cell populations.

Since differentiated cells do not express p57^{Kip2} (Fig. 3.2J-L) and since p27^{Kip1} (CDKN1B) knockout mice exhibit differentiated pituitary tumors²³⁸⁻²⁴⁰, we assessed expression of p27^{Kip1} during pituitary development. In e13.5 pituitaries,

p27^{Kip1} expression appeared complementary to p57^{Kip2} (Fig. 3.3A-C) and p27^{Kip1}-positive cells appeared to be distinct from proliferating progenitors as assessed by cyclin D2 and Ki67 labeling (Fig. 3.3D, E). The ventral position of p27^{Kip1}-positive cells (Fig. 3.3B) is consistent with the position of early differentiated cells and indeed, all Tpit-positive (corticotroph) cells were found to co-label with p27^{Kip1} (Fig. 3.3F, I). Other p27^{Kip1}-positive cells coexpress α GSU (data not shown). This reciprocal pattern of p57^{Kip2} and p27^{Kip1} expression (Fig. 3.3G-I) clearly delineated the non-cycling precursor and differentiated cell populations. The p57^{Kip2}/p27^{Kip1} co-labeling did reveal a subset of p57^{Kip2}-positive and p27^{Kip1}-weakly positive cells that likely represent the transition between precursors and differentiated cells. Thus, p27^{Kip1} appears to replace p57^{Kip2} prior to differentiation.

4.3. P57^{KIP2} PROMOTES CELL CYCLE EXIT OF PROLIFERATING PROGENITORS

Since the cell cycle inhibitor p57^{Kip2} appears in a cell population that seems to be intermediate between proliferating progenitors and differentiated cells, we investigated p57^{Kip2}-deficient mice to gain insight into the function of p57^{Kip2} in pituitary development. If p57^{Kip2} plays a role in cell cycle exit of pituitary progenitors, we expect an effect of p57^{Kip2} deficiency between e10.5 and e14.5 when cell expansion takes place. We indeed observed signs of increased proliferation at e12.5 (Fig. 3.4F compared to A) and clear hyperplasia was observed at e14.5 and later (Fig. 3.4G, H, I compared to B, C, D). BrdU incorporation was used to show increased proliferation in e14.5 p57^{Kip2}-/- pituitaries (Fig. 3.4P compared to K). The AL hyperplasia of p57^{Kip2}-/- pituitaries was also evident using co-labeling for pHH3 and Ki67 (Fig. 3.4Q compared to L). Since the normal p57^{Kip2}-positive pituitary cells also express cyclin E, we tested whether loss of p57^{Kip2} may affect cyclin E expression: this is not the case (Fig. 3.4M, R). The BrdU-positive proliferating cells that appear in the developing AL of p57^{Kip2}-/- mice do not express cyclin E. This suggests that switch-on of cyclin E is independent of p57^{Kip2} and it occurs independently of G1/S transition (Fig. 3.4M,

R). Similarly, we tested whether loss of $p57^{Kip2}$ affects appearance of $p27^{Kip1}$. Since $p27^{Kip1}$ expression is unaffected in $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries (Fig. 3.4N, S), the control of $p27^{Kip1}$ also appears independent of $p57^{Kip2}$.

The $p57^{Kip2}$ -dependent pituitary hyperplasia could have led to tumor formation. However, it was found that hyperplastic $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries regress starting at about e17.5 (Fig. 3.4H-J compared to C-E). This regression appears due to apoptosis as supported by the appearance of cleaved caspase 3-positive cells. Whereas the normal pituitary does not have any caspase 3-positive cells (Fig. 3.4O), the $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries exhibit caspase 3-positive nuclei (Fig. 3.4T and T1), in agreement with data in the pancreas²⁵⁷. None of the caspase 3-positive cells express the differentiation markers ACTH or α GSU, suggesting that undifferentiated progenitors undergo apoptosis.

The $p57^{Kip2}$ knockout suggests that this cell cycle inhibitor may control cell cycle exit of pituitary progenitors. In order to directly test this hypothesis, we constructed transgenic mice (Fig. 3.5A) to drive $p57^{Kip2}$ expression in all cells (including proliferating BrdU-positive cells) of the developing pituitary using the Pitx1 promoter^{153,328} (Fig. 3.5B-D). Transgenic embryos (e14.5) expressing this $p57^{Kip2}$ transgene exhibit a hypoplastic anterior pituitary (Fig. 3.5F compared to E) and fewer BrdU-positive cells (Fig. 3.5H compared to G). Taken together, both $p57^{Kip2}$ loss- and gain-of-function support the model that this cell cycle inhibitor is playing a key role in cell cycle exit of pituitary progenitors during development.

4.4. CELL DIFFERENTIATION IS INDEPENDENT OF $P57^{KIP2}$

The expression of $p57^{Kip2}$ in a cell population that appears intermediate between progenitors and differentiated cells and the apparent role of $p57^{Kip2}$ in cell cycle exit of pituitary progenitors may suggest that $p57^{Kip2}$ is also a signal for differentiation. This hypothesis was assessed at a stage of development (e14.5) when different lineages have appeared as revealed with Tpit as a marker for corticotrophs, α GSU for thyrotrophs and gonadotrophs and Pit1, a marker of GH and PRL lineages. Immunofluorescence analysis of $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries for these markers clearly showed that differentiation is not prevented in absence of $p57^{Kip2}$

(Fig. 3.4X-Z compared to U-W). It is also noteworthy that the absence of $p57^{Kip2}$ did not lead to proliferation of differentiated cells as no BrdU-positive cells coexpress a differentiation marker in $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries (Fig. 3.4X-Z). It thus appears that only undifferentiated pituitary progenitors are proliferating in absence of $p57^{Kip2}$. These conclusions are corroborated in $p57^{Kip2}$ gain-of-function mice since the hypoplastic transgenic pituitaries have a few Tpit and α GSU-positive differentiated cells (Fig. 3.5J).

While these data collectively suggest that $p57^{Kip2}$ is critical for exit from the cell cycle during pituitary development, they also suggest that cell differentiation is controlled independently of $p57^{Kip2}$ and not coupled to cell cycle exit. It was similarly shown that loss of $p27^{Kip1}$ does not prevent POMC lineage differentiation²³⁸.

4.5. UNDIFFERENTIATED TPIT-/- CELLS ARE BLOCKED IN P57^{KIP2}-POSITIVE NON-CYCLING STATE

Pituitary differentiation thus appears independent of $p57^{Kip2}$ (Fig. 3.4U-Z) and $p27^{Kip1}$ ²³⁸. In order to assess whether differentiation has a regulatory function in control of cell cycle exit and/or $p57^{Kip2}$ or $p27^{Kip1}$ expression, we analyzed Tpit-/- pituitaries that are deficient for POMC lineage differentiation. The most striking phenotype of Tpit-/- pituitaries is a change in cell fate in the IL¹⁹⁷. Whereas the normal IL is entirely constituted of melanotrophs that are positive for Tpit (Fig. 3.6B), the mutant Tpit-/- IL mostly contains undifferentiated cells together with a minority of cells that have changed fate to gonadotrophs (α GSU-positive, Fig. 3.6I compared to A) and more rarely POMC (Fig. 3.6P). About 30% of cells present in the Tpit-/- IL (Fig. 3.6P) remain $p57^{Kip2}$ -positive (Fig. 3.6F) compared to the absence of $p57^{Kip2}$ in the normal IL (Fig. 3.6C) and they do not proliferate (data not shown). None of the $p57^{Kip2}$ -positive cells co-label with POMC or α GSU (Fig. 3.6E-G). In addition, these $p57^{Kip2}$ -positive cells co-label for the most part with Tpit- β Gal (Fig. 3.6H). Indeed, the mutant Tpit-/- mice do not produce intact Tpit¹⁹⁷ but a chimeric gene product constituted of the Tpit N-terminus fused to β Gal (Fig. 3.6J). This subset of cells does not co-label with the differentiation

marker α GSU (Fig. 3.6I-K) suggesting that the chimeric gene product is expressed in undifferentiated cells. This result suggests that gonadotroph (α GSU-expressing) differentiation leads to extinction of the *Tpit*- β Gal locus. In contrast, the few *Tpit*^{-/-} IL cells that switch-on POMC also maintain expression of the *Tpit*- β Gal fusion gene product (Fig. 3.6L) in agreement with maintenance of *Tpit* expression in adult melanotrophs. Thus, many cells of the *Tpit*^{-/-} IL are blocked in the $p57^{\text{Kip2}}$ -positive non-cycling state. This suggests that differentiation, whether into the POMC or gonadotroph (α GSU) lineage, switches off $p57^{\text{Kip2}}$ expression.

We have shown above that $p27^{\text{Kip1}}$ is switched on in differentiated pituitary cells (Fig. 3.3). In order to test whether the failure of *Tpit*^{-/-} IL cells to differentiate affects expression of $p27^{\text{Kip1}}$, we assessed its expression by immunofluorescence and found that most cells of the mutant IL express $p27^{\text{Kip1}}$ (Fig. 3.6M), including the subset of $p57^{\text{Kip2}}$ -expressing cells (Fig. 3.6M-P). These data indicate that the control of $p27^{\text{Kip1}}$ expression is independent of differentiation and of $p57^{\text{Kip2}}$ expression.

In conclusion, the analysis of *Tpit*^{-/-} pituitaries suggests that $p57^{\text{Kip2}}$ -mediated cell cycle exit yields a transient population of non-cycling precursors independently of the differentiation process but that this process feedbacks to repress $p57^{\text{Kip2}}$ expression.

5. DISCUSSION

The present work demonstrates the presence of non-cycling precursor cells at a critical time in pituitary development when proliferating progenitors exit the cell cycle and prepare to undergo differentiation. These non-cycling precursors are restricted both spatially and temporally during normal development and they are marked by expression of p57^{Kip2} and cyclin E. p57^{Kip2} appears to be a critical regulator for progenitor cell cycle exit and its induction is independent of differentiation.

The role of cyclin E expression in non-cycling precursors is intriguing. Cyclin E could be involved in early differentiation processes similar to its purported role in *Drosophila* neuronal lineage specification³²⁹; however, its restricted expression in non-cycling precursors is not suggestive of involvement in a particular differentiated lineage. Alternatively, cyclin E has been associated with endoreplication in trophoblast giant cells²¹¹; our analyses clearly do not support such possibility since no BrdU incorporation was observed in cyclin E-positive cells (Fig. 3.3H). Finally, this expression may relate to a kinase-independent function of cyclin E²¹⁴.

Thus during normal pituitary development, p57^{Kip2} controls cell cycle exit of proliferating progenitors to yield non-cycling undifferentiated precursors (Fig. 3.7A). These p57^{Kip2} and cyclin E-positive cells may then undergo differentiation into different lineages; for corticotrophs and melanotrophs, terminal differentiation depends on Tpit (Fig. 3.7B). Differentiation is accompanied by extinction of p57^{Kip2} and cyclin E expression, and appearance of p27^{Kip1}. The expansion of proliferating progenitors in absence of p57^{Kip2} (Fig. 3.7C) taken together with the small number of these cells in p57^{Kip2}-overexpressing pituitaries support the conclusion that p57^{Kip2} is a critical regulator of cell cycle exit for pituitary progenitors. The importance of p57^{Kip2}-dependent cell cycle exit for normal development is best highlighted by the extensive cell loss and apoptosis observed in p57^{Kip2}^{-/-} pituitaries beyond e18.5. Finally, the organomegaly that has been reported in p57^{Kip2}^{-/-} mice suggests that similar situations might exist in

other tissues²⁴⁹; the nature of excess cells in other $p57^{Kip2-/-}$ tissues has not been defined.

5.1. INDEPENDENT PROGRAMS FOR CELL CYCLE EXIT AND DIFFERENTIATION

Strikingly, the $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries have normal distribution of differentiated cells, indicating that accumulation of progenitors and absence of $p57^{Kip2}$ does not impair the differentiation program. Differentiation is thus controlled independently of $p57^{Kip2}$. Further, the differentiated cells of $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries express $p27^{Kip1}$ as do normally differentiated pituitary cells, clearly showing that $p27^{Kip1}$ expression is not dependent on the transient expression of $p57^{Kip2}$. Conversely, expression of $p57^{Kip2}$ itself, as well as $p27^{Kip1}$, is independent of differentiation as shown in $Tpit^{-/-}$ mice as these mice accumulate non-cycling precursors that co-express $p57^{Kip2}$ and $p27^{Kip1}$ (Fig. 3.7D).

Cell differentiation is accompanied by extinction of $p57^{Kip2}$ expression: this is also observed in $Tpit^{-/-}$ mice in which a cell fate change has occurred. Indeed, cells that should have become POMC change fate to become gonadotroph (α GSU and SF1 positive): such cells also switch off $p57^{Kip2}$ expression as do normal cells. These data suggest that the differentiation program represses the precursor program as marked by $p57^{Kip2}$ expression and that in POMC cells, $Tpit$ is not the sole repressor of $p57^{Kip2}$. Collectively, this work demonstrates the independence of the program for cell cycle exit from differentiation; differentiation is however a property of postmitotic cells.

The control of $p57^{Kip2}$ expression in progenitors may be cell autonomous but it may also be triggered by extracellular signals: the Notch pathway may represent a candidate for this as $Rbp-J$ and $Hes1$ knockout mice exhibit premature differentiation and cell cycle exit¹⁴³. Indeed, $p57^{Kip2}$ expression was shown to be a direct target of the repressor $Hes1$ ²⁵⁷. The present demonstration of uncoupled cell cycle exit and differentiation may warrant a reassessment of the relative roles of signals such as the Notch pathways in early pituitary organogenesis.

5.2. STEMNESS, CELL CYCLE EXIT AND DIFFERENTIATION

We imagine that the bulk of proliferating pituitary progenitors studied in the present work represents committed rather than stem cells. Be that as it may, the uncoupling of cell cycle exit and differentiation shown here may be consistent with cancer stem cell models which proposed that a small number of stem cells underlie the growth of differentiated tumours³³⁰. It is noteworthy that only progenitor cells are expanded in $p57^{Kip2-/-}$ pituitaries but not the differentiated cells. Loss of $p57^{Kip2}$ expression may thus predispose to tumorigenesis. This would be consistent with the identification of $p57^{Kip2}$ mutations or imprinting defects that prevent $p57^{Kip2}$ expression in Beckwith-Wiedemann syndrome, an overgrowth syndrome characterized by tumor susceptibility^{252,331}.

Conversely, the program of cell cycle exit exerted by $p57^{Kip2}$ may be an important feature of normal differentiation. Considerable effort is currently applied towards the targeted differentiation of stem cells into specific differentiation pathways such as for production of insulin-secreting pancreatic β cells or dopaminergic neurons. This differentiation is targeted by expression of restricted transcription factors that trigger the differentiation program. The uncoupling between cell cycle exit and differentiation may be an important and poorly recognized parameter for such targeted differentiation. Thus, programmed cell cycle exit of stem cells may be required for the efficient production of appropriately differentiated cells. The implications of the present finding for the therapeutic use of stem cells remain to be explored.

6. MATERIALS AND METHODS

6.1. MICE AND BRDU INJECTION

The p57^{Kip2} (cdkn1c) mice were obtained from Jackson Laboratory (B6.129S7-Cdkn1ctm1Sje/J) and maintained and genotyped as described. The Tpit knockout mice were previously described¹⁹⁷. For BrdU injection, pregnant females were injected intra-peritoneally with 100mg/kg of BrdU in PBS 1h before sacrifice.

6.2. GENERATION OF TRANSGENIC MICE

The p57^{Kip2} cDNA was inserted downstream of the 4.2 kb Pitx1 promoter³²⁸. Transgenic mice were generated as described³³. Pregnant females were injected with BrdU and embryos were taken by caesarian at day e14.5. For genotyping, 5'-TGCGCGCACTGTCGTTT-3' (Pitx1) and 5'-TGGAAGTTGAAGTCCCAGCGGTT-3' (p57^{Kip2}) primers were used.

6.3. TISSUE PREPARATION AND IMMUNOFLUORESCENCE

Embryos were fixed, embedded in paraffin and treated as previously described^{150,153}. The following antibodies were used: phospho-histone H3 (Upstate, No. 06-570), BrdU (DSHB), Tpit³⁵, Cyclin E (Santa Cruz, M-20), Cyclin D1 (BD Biosciences, No. 556470), Cyclin D2 (Santa Cruz, M-20), p57^{Kip2} (Santa Cruz H-91), p57^{Kip2} (Lab Vision, Ab-3), POMC (Cortex Biochem, CR1096M), β GSU (NIH, AFP5191792), p27^{Kip1} (BD Biosciences, No. 610241), Ki67 (Lab Vision, Ab-5), cleaved caspase-3 (Cell Signaling, No. 9661), Pit1 (Simon Rhodes, University of Indiana), and Pitx1¹⁵³. Secondary antibody detection was achieved by immunofluorescence with Alexa-conjugated antibodies or using biotin-conjugated antibodies followed by Alexa-conjugated streptavidin (Invitrogen, Molecular Probes).

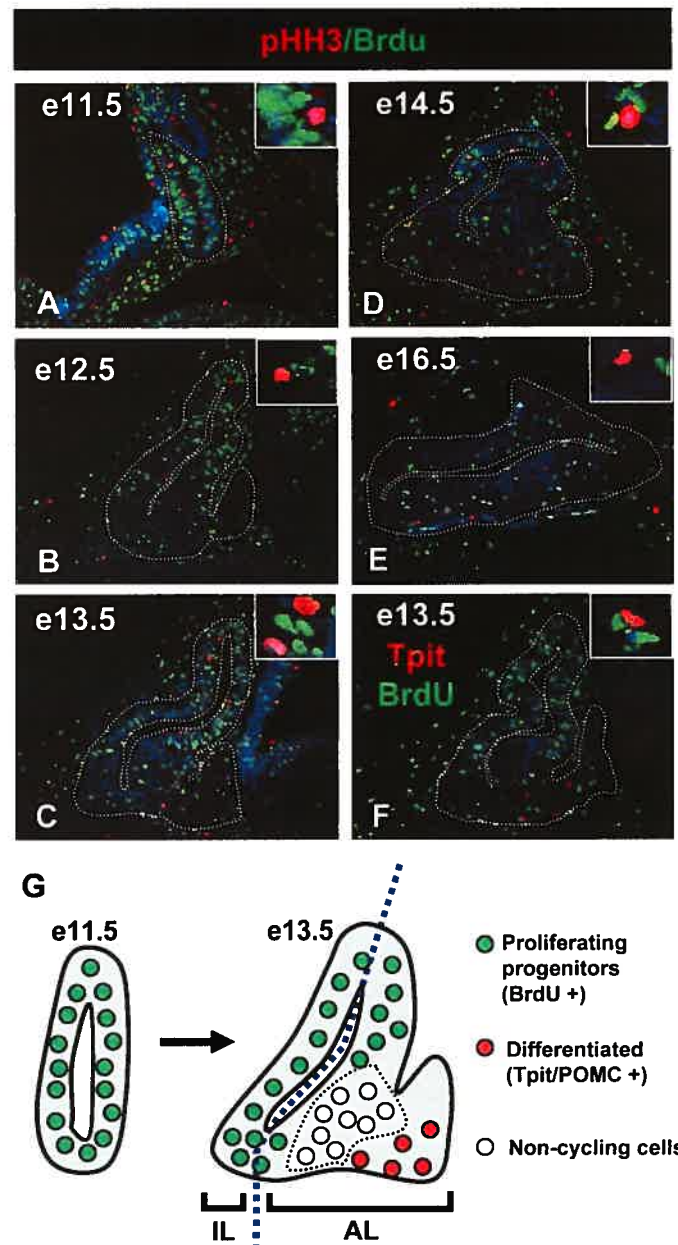


Figure 3.1. A sub-population of non-cycling undifferentiated pituitary cells.

(A to E) Co-labeling with S phase marker BrdU (green) and M phase marker phospho-Histone H3 (pHH3, red) identifies proliferating cells at different stages of pituitary development. Nuclei are stained blue with Hoechst 33258 dye. (F) The first corticotroph cells present at e13.5 are revealed by Tpit (red) in the anterior lobe. Co-localization with BrdU (green) revealed mutually exclusive expression patterns. (G) Schematic representation of the spatial organization of the different pituitary cell populations at e11.5 and e13.5. The proliferating progenitors (green) are mostly found around the lumen while the differentiated cells (red) appear on the ventral side of the developing anterior lobe (AL) of the gland. A group of non-cycling undifferentiated cells (white) are present between proliferating and differentiated cells.

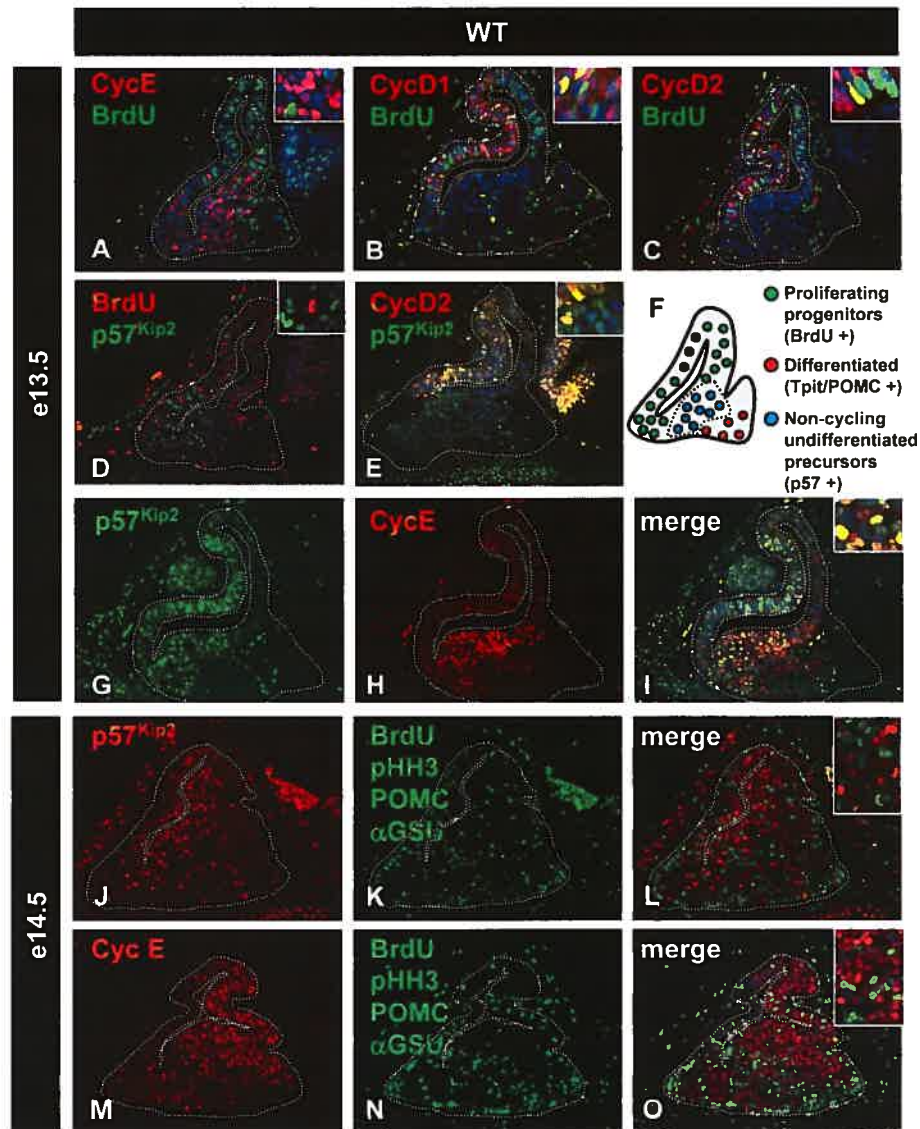


Figure 3.2. p57^{Kip2} and cyclin E mark non-cycling undifferentiated cells.

Co-localization experiments were performed with different proliferation and differentiation markers at e13.5 and e14.5, a developmental period when non-cycling undifferentiated cells are most abundant. (A) BrdU-positive cells are not co-labeled with cyclin E, a cyclin thought to be involved in G1-S transition. However, cyclin D1 (B) and cyclin D2 (C) co-localized partially with BrdU, suggesting that cyclin D expression is maintained until the beginning of S phase. (D) p57^{Kip2}-positive cells have a similar distribution as cyclin E-positive cells. (E) These cells do not co-label with cyclin D2 in the AL but they do in the IL. (G-I) Co-localization of p57^{Kip2} and cyclin E expression in cells of the developing anterior pituitary. (J-O) In order to clearly assess differentiation status of cyclin E and p57^{Kip2}-positive cells, we performed co-localization of p57^{Kip2} (J) and cyclin E (M) with a mix of proliferation and differentiation markers (K, N). Proliferating cells are identified by nuclear staining for BrdU and pHH3 while differentiated cells are marked by cytoplasmic labeling for POMC and αGSU (L, O). p57^{Kip2} and cyclin E-positive cells do not co-label with any of these markers, indicating that these non-cycling cells are undifferentiated. (F) Schematic representation of the different cell populations at e13.5/e14.5 showing non-cycling undifferentiated precursors physically located between proliferating progenitors and differentiated cells.

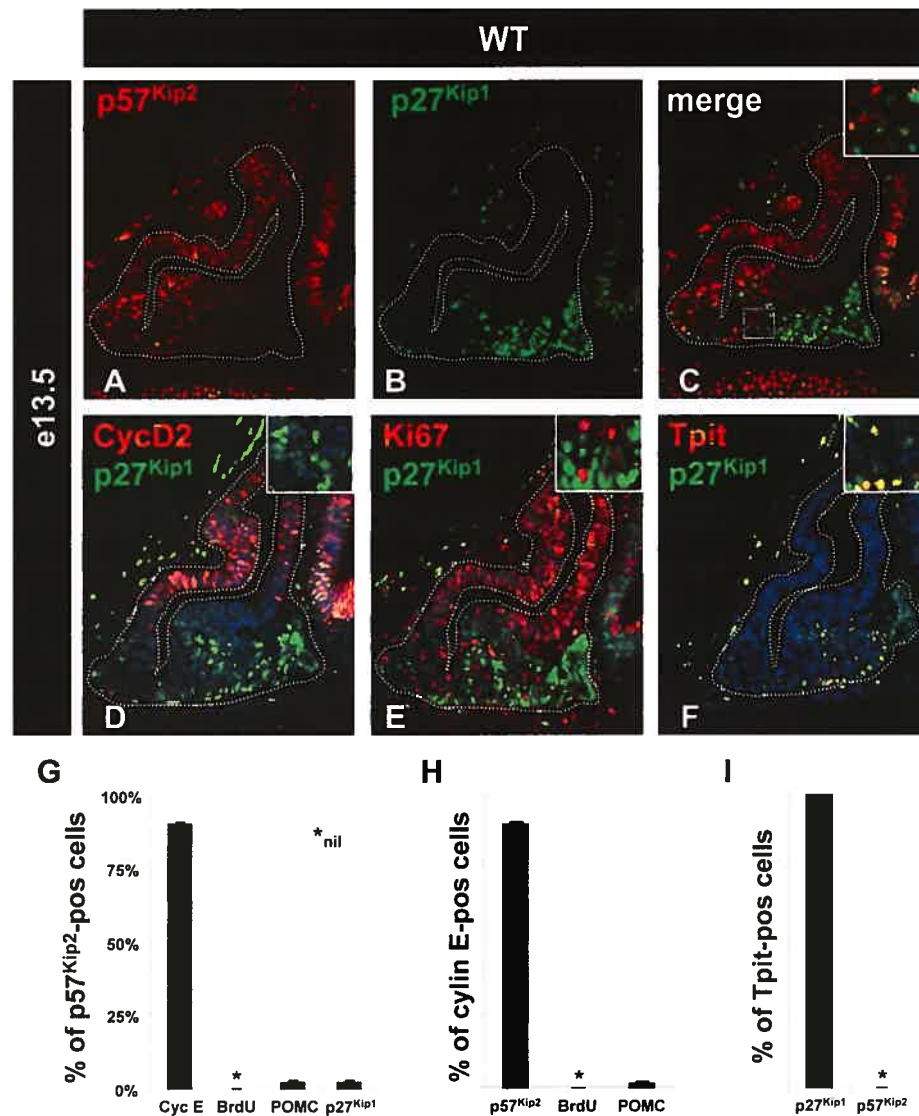


Figure 3.3. p27^{Kip1} replaces p57^{Kip2} during pituitary differentiation.

The expression of another member of the Cip/Kip family p27^{Kip1} (B) is complementary to the expression of p57^{Kip2} (A) at e13.5. There is a small overlap between the two populations (C). The expression of p27^{Kip1} is not correlated with either proliferation markers cyclin D2 (D) or Ki67 (E). The ventral/rostral expression pattern of p27^{Kip1} suggests that it is expressed in non-proliferating differentiated cells. Indeed, all Tpit-positive corticotroph cells co-express p27^{Kip1} (F). (G-I) Quantification of co-labeling for different markers in the population of non-cycling cells. This data is presented relative to p57^{Kip2}- (G), cyclin E- (H) or Tpit-positive (I) cells.

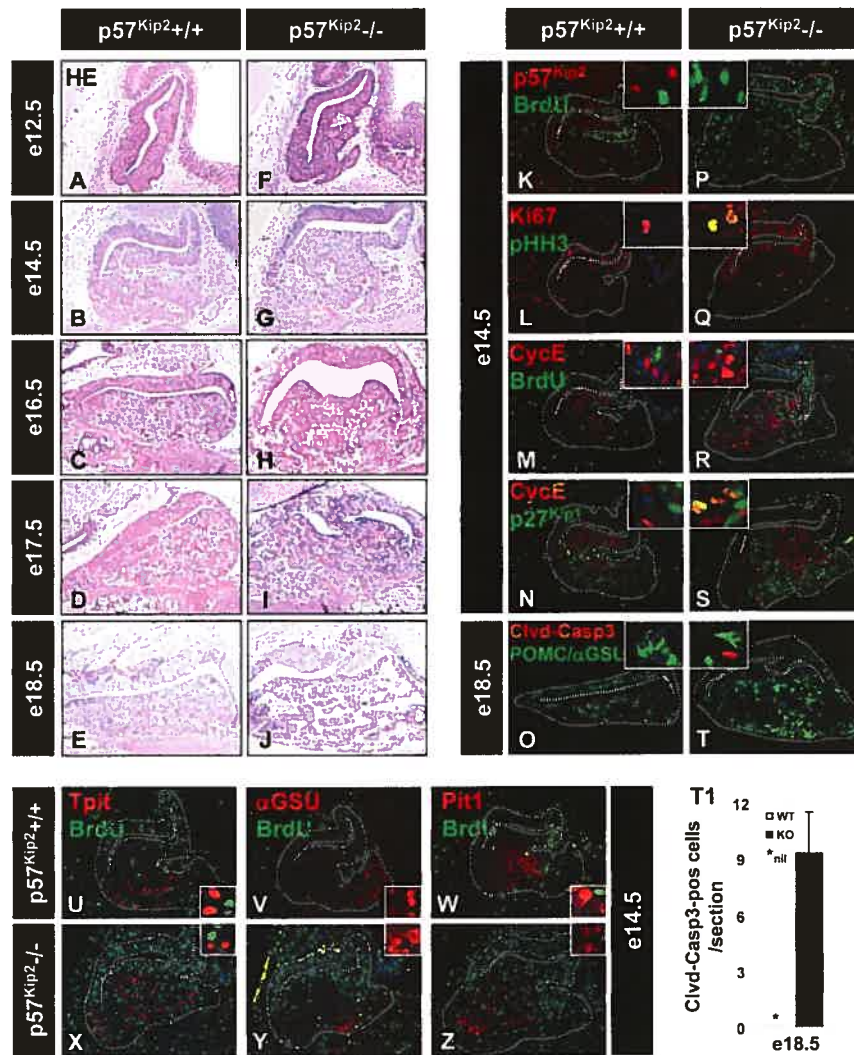


Figure 3.4. p57^{Kip2} controls precursor cell cycle exit but not differentiation.

(A-J) Knockout of p57^{Kip2} affects pituitary development as revealed by hematoxylin-eosin staining between e12.5 and e18.5. Absence of p57^{Kip2} leads to early pituitary hyperplasia between e12.5 and e17.5 (compare F-I to A-D) and later (e18.5) to tissue loss (compare J to E). (K-T) Proliferation and apoptosis in p57^{Kip2}^{-/-} pituitaries. p57^{Kip2} gene disruption leads to increased number of proliferating cells in the anterior lobe as revealed by BrdU incorporation (compare P to K) and by the mitosis markers Ki67 and pHH3 (compare Q to L). An increased number of cyclin E-positive cells is also observed in p57^{Kip2}^{-/-} pituitaries but these cells appear to have exited the cell cycle as they do not label for BrdU (R compared to M). Expression of p27^{Kip1} is not altered in p57^{Kip2}^{-/-} pituitaries (S compared to N) but apoptotic cells are detected by cleaved-caspase-3 immunofluorescence in knockout (quantification in T1) but never in normal pituitaries (T compared to O), thus explaining the tissue loss observed from e18.5. Apoptotic cells were never found to express differentiation markers suggesting that undifferentiated progenitors are undergoing apoptosis. (U-Z). Unaltered differentiation in p57^{Kip2}^{-/-} pituitaries. Expression of differentiation markers in WT (U to W) and p57^{Kip2} knockout (X to Z) are similar for Tpit (corticotrophs, U, X), αGSU (gonadotrophs, V, Y) or Pit1 (somatotrophs, lactotrophs, thyrotrophs, W, Z). It is noteworthy that p57^{Kip2}-dependent hyperplasia is accounted for by progenitor proliferation but does not involve proliferation of differentiated cells as indicated by the absence of overlap between BrdU and differentiation markers.

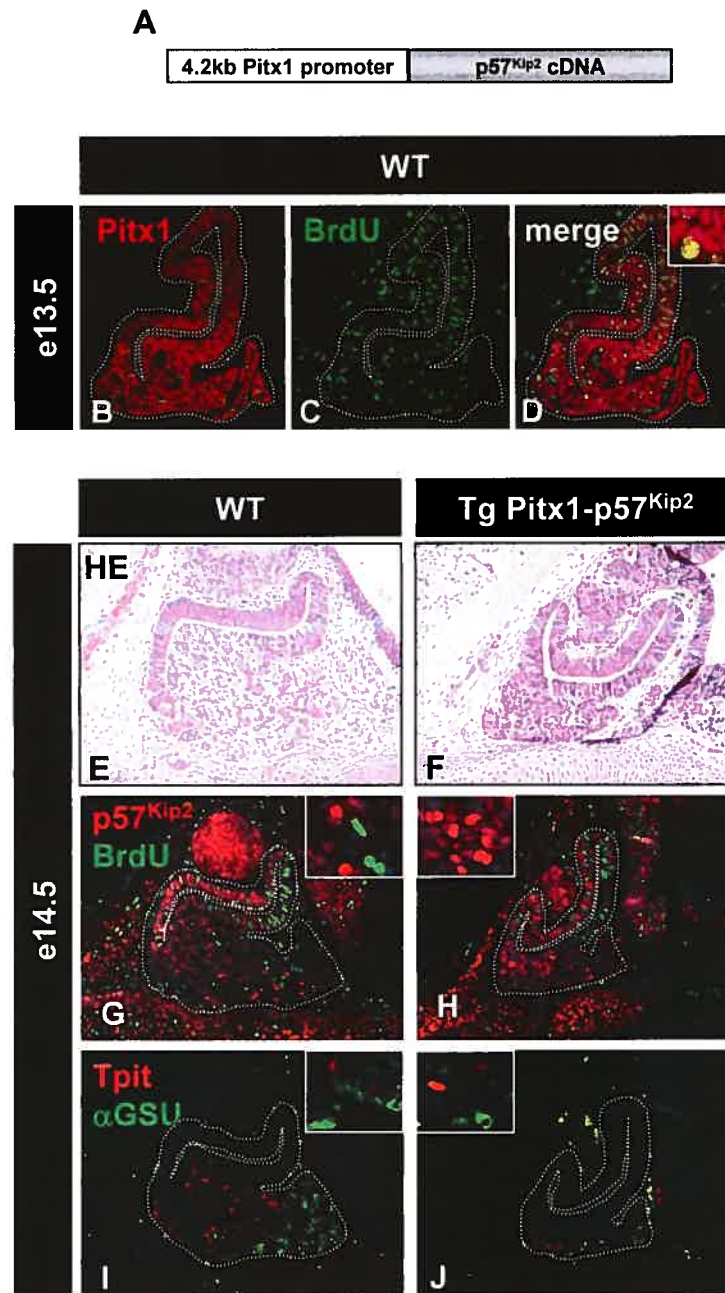


Figure 3.5. Early p57^{Kip2} expression leads to pituitary hypoplasia but doesn't affect differentiation.

A transgene driving p57^{Kip2} expression under control of the Pitx1 promoter (A) will lead to early expression throughout the developing pituitary (B) including BrdU-positive cells (C, D). The early ectopic expression of p57^{Kip2} leads to pituitary hypoplasia (F compared to E). This hypoplasia correlates with fewer proliferating cells in the anterior lobe (H compared to G). Differentiation is not affected as revealed by Tpit and αGSU-positive cells (I, J).

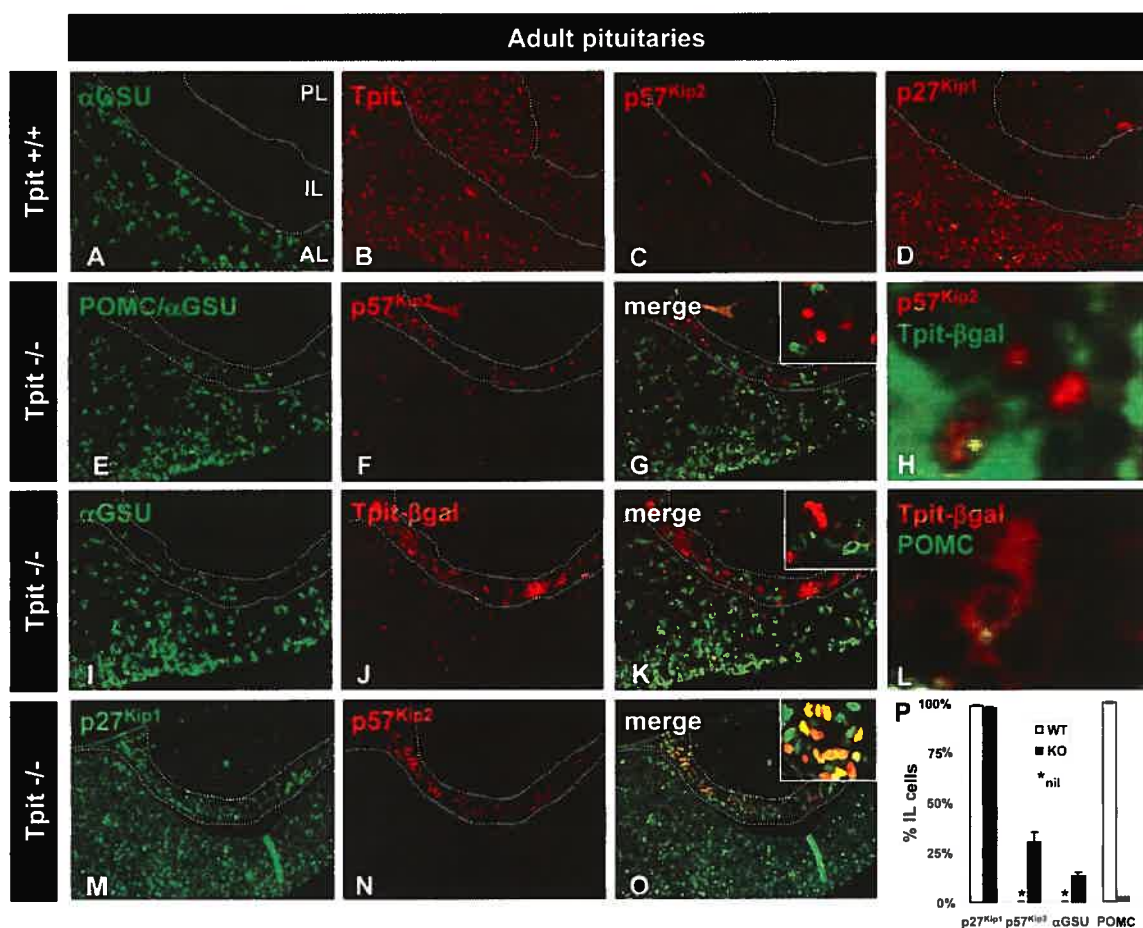


Figure 3.6. In absence of Tpit differentiation factor, undifferentiated cells are blocked in p57^{Kip2}-positive non-cycling precursor state.

Tpit loss-of-function (Tpit^{-/-}) prevents melanotroph and corticotroph differentiation. The normal adult pituitary intermediate lobe (IL, between dotted lines) does not express cytoplasmic αGSU (A) but all its melanotroph cells express nuclear Tpit (B). This tissue does not have p57^{Kip2}-positive cells (C) but most cells are p27^{Kip1}-positive (D). As previously described¹⁹⁷, a small number of gonadotroph cells appear in the IL in absence of Tpit, as revealed by αGSU staining together with a few POMC cells (E). The Tpit^{-/-} IL has a large number of p57^{Kip2}-positive cells (F) in contrast to the normal IL (C). There is no overlap between differentiated and p57^{Kip2}-positive cells (G). The Tpit targeting vector included a βgal gene fused in-phase with the Tpit first exon leading to production of a Tpit-βgal fusion protein that is present in p57^{Kip2}-positive cells (H) as well as in POMC-positive cells (L) but not in fate changed gonadotrophs (I-K). The p57^{Kip2}-positive cells of the mutant IL (N) are not identical to their counterparts in normal development since they are also p27^{Kip1}-positive (M-O). (P) Quantification of marker expression in IL of normal and Tpit^{-/-} pituitaries.

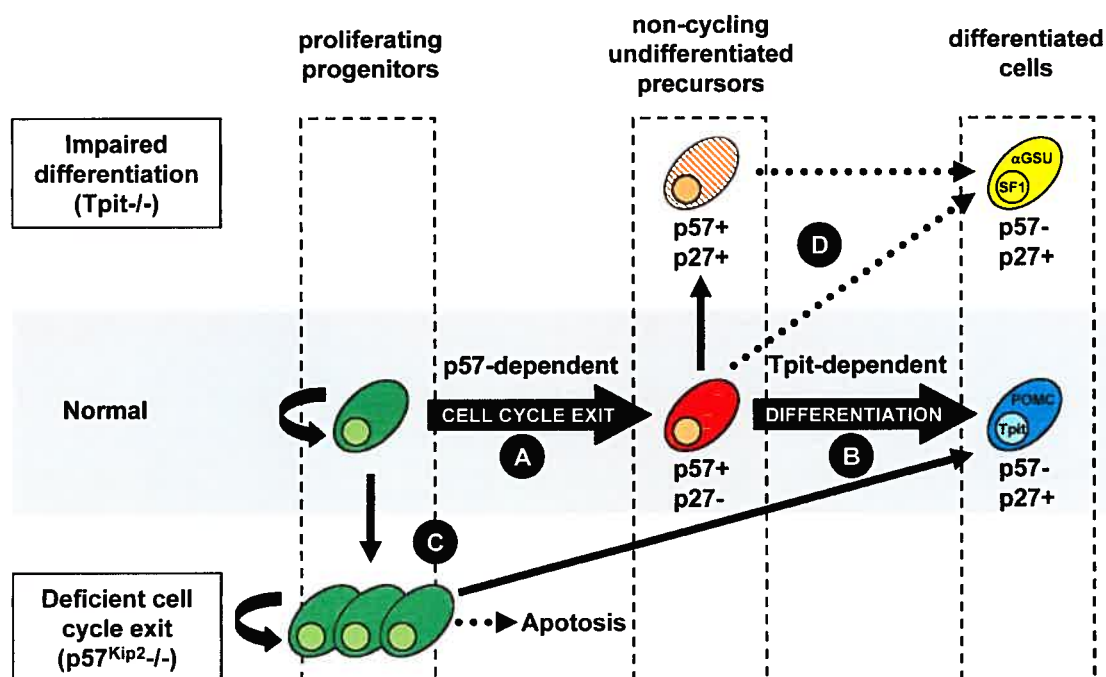


Figure 3.7. Uncoupling of proliferation and differentiation during pituitary development.

The present work defined during normal pituitary development a transient population of non-cycling undifferentiated precursors (red) that are marked by expression of p57^{Kip2} and cyclin E. Following their expansion, proliferative pituitary progenitors (green) exit the cell cycle under control of p57^{Kip2} (A) to yield non-cycling precursors (red). These transient cells then switch-off p57^{Kip2} and switch-on p27^{Kip1} in parallel with differentiation into various hormone producing lineages (B). This sequence was characterized in detail for the Tpit-dependent corticotroph (POMC) lineage (blue) that is the earliest to reach terminal differentiation in the anterior pituitary. In absence of p57^{Kip2}, the cdk inhibitor that appears to drive normal cell cycle exit, pituitary progenitors initially overgrow and then undergo extensive apoptosis late in fetal life (C). However, the absence of p57^{Kip2} does not prevent the later expression of p27^{Kip1} or differentiation into various lineages. The p57^{Kip2}-dependent cell cycle exit of progenitors therefore appears to be controlled independently of cell differentiation. In agreement with this, the blockade of cell differentiation observed in Tpit^{-/-} mice (D) leads to accumulation of non-cycling undifferentiated precursors (orange) that are p57^{Kip2} and p27^{Kip1}-positive. However, a small fraction of cells in the intermediate pituitary lobe of Tpit^{-/-} mutant mice do differentiate, either through cell fate change into gonadotrophs (yellow, αGSU and SF1-positive) or more rarely, into POMC-positive cells. The cells that do differentiate switch-off p57^{Kip2} suggesting that the differentiation process itself is responsible for p57^{Kip2} extinction.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to many colleagues from the lab for their comments and in particular to Claude Sardet and Jean-Marie Blanchard, Montpellier, for comments on the manuscript. We thank Simon Rhodes, University of Indiana, for his generous gift of Pit1 antibody and the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA52242. The excellent work of Annie Vallée and Julie D'Amours, respectively for tissue preparations and animal maintenance, is acknowledged. We are grateful to Anne-Marie Pulichino for Tpit knockout mice. The expert secretarial assistance of Lise Laroche was greatly appreciated. This work was supported by fellowship from *Fonds des chercheurs et aide à la recherche-Fonds de la recherche en santé du Québec* (FCAR-FRSQ) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to SB, and by research grants to JD from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and National Cancer Institute of Canada (NCIC).

CHAPITRE 4 : CYCLIN E IN CORTICOTROPH CELL PROLIFERATION AND CUSHING DISEASE

Steve Bilodeau¹, Audrey Roussel-Gervais¹, Jacques Drouin^{1‡}

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

Keywords: proliferation; cyclins; p27^{Kip1}; pituitary; POMC; Tpit

‡To whom correspondence should be addressed:

Jacques Drouin
Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)
110, avenue des Pins Ouest
Montréal QC Canada H2W 1R7
Tel: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575
[REDACTED]

1. AVANT-PROPOS

L'hypophyse est un organe très sensible à la tumorigénèse. En fait, les statistiques révèlent qu'une personne sur cinq développera un adénome hypophysaire au cours de sa vie. Au Chapitre 3, j'ai mis en évidence les étapes préalables à l'établissement de la lignée corticotrope lors du développement normal. Le présent Chapitre vise à comprendre spécifiquement des événements qui interviendraient après la différenciation et qui font partie des mécanismes de tumorigénèse dans la maladie de Cushing (adénome corticotrope).

Nos résultats démontrent que les cellules corticotropes subissent une maturation post-différenciation qui inclut l'expression de régulateurs du cycle cellulaire sans prolifération. Cependant dans la maladie de Cushing, les cellules corticotropes réintègrent le cycle cellulaire et prolifèrent. L'expression de la cycline E ainsi que la perte de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} sont observées dans une majorité d'adénomes corticotropes. De plus, l'expression de la cycline E à l'aide d'un transgène dirigé dans les cellules POMC produit la réentrée dans le cycle cellulaire. Au Chapitre 2, j'ai démontré l'expression aberrante de Brg1 et HDAC2 dans les tumeurs corticotropes de la maladie de Cushing ; deux protéines impliquées dans la répression du gène POMC par les Gc. Dans les cellules corticotropes, la réduction d'expression de Brg1 ainsi que la perte de l'activité histone déacétylase entraînent l'expression de la cycline E. L'expression aberrante de Brg1 et/ou HDAC2 est probablement le lien entre la résistance aux Gc et la tumorigénèse dans la maladie de Cushing. Le Chapitre 4 met en lumière un mécanisme potentiel de transformation des cellules corticotropes lors du développement d'un adénome.

2. SUMMARY

The pituitary is particularly sensitive to tumor formation and we have recently identified the loss of Brg1 or HDAC2 function as causative for glucocorticoid resistance in corticotroph adenomas. Corticotroph adenomas, the hallmark of Cushing disease, produce excessive ACTH as a result of the loss of pituitary glucocorticoid negative feedback. In order to relate the loss of Brg1 or HDAC2 activity to the tumorigenic process in corticotroph cells, we investigated the effect of these loss-of-functions on cyclin E expression. In AtT-20 cells, the loss of both of these activities results in increased cyclin E expression. Whereas cyclin E is not detected at significant levels in normal corticotroph cells, it is upregulated in a large number of corticotroph adenoma, particularly in those that exhibit Brg1 loss-of-function. In corticotroph adenomas, the upregulation of cyclin E is very often associated with the loss of expression for the cell cycle inhibitor p27^{Kip1}. Consistent with a role of cyclin E in cell cycle entry, transgenic overexpression of cyclin E in pituitary corticotroph led to re-entry into the cell cycle of these differentiated cells. Collectively, these results suggest a possible mechanism for proliferation of differentiated POMC-expressing cells in Cushing disease.

3. INTRODUCTION

The pituitary gland, an essential organ for homeostasis, is a very convenient model to study mechanisms of development and tumorigenesis. Pituitary organogenesis requires interactions between the oral ectoderm and neural epithelium. The adult gland contains three different lobes: the posterior lobe (PL) is made of axonal projections coming from the hypothalamus, the intermediate lobe (IL) is exclusively constituted of melanotrophs and the anterior lobe (AL) combines five different cell types. Numerous transcription factors have been shown to control differentiation: *Tpit* for corticotrophs and melanotrophs (POMC)¹⁹⁷, *GATA2* and *SF1* for gonadotrophs (α GSU, LH, FSH)^{189,194}, and *Pit1* for somatotrophs (GH), lactotrophs (PRL) and thyrotrophs (TSH)^{168,183}. Hormones expressed by these different cell types affect numerous biological processes. Specific cell losses lead to isolated hormonal deficits that result in neonatal death (POMC)^{35,198,199,332}, dwarfism (GH)³³³ or hypogonadism (LH/FSH)³³⁴. Reciprocally, the presence of pituitary adenomas can cause excessive hormone production like in Cushing disease (POMC)³⁰¹ and acromegaly (GH)³³⁵. The occurrence of pituitary adenomas in the American population is 22.4%, which is one of the highest rates of spontaneous tumor in human tissues and account for 10% of total intracranial tumors²⁰¹.

As in humans, mice are very sensitive to pituitary tumorigenesis; as revealed by the abundance of mouse models developing tumors²⁰². Every tumorigenesis process involves aberrant cell cycle control. Pairs of cyclins and cyclin-dependent kinases (cdk) regulate progression through the cycle. In addition, the presence of cdk inhibitors (cdki) allows tight modulation of proliferation rates. The cdki are divided in two families: the Cip/Kip (*p21^{Cip1}*, *p27^{Kip1}* and *p57^{Kip2}*) and INK4 (*p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}*, *p18^{INK4c}* and *p19^{INK4d}*)²⁰⁴. The INK4 family inhibits the activity of the cyclin D/cdk4 complex to regulate G1 progression while the Cip/Kip family is more effective on cdk2 and consequently S and G2 phases²⁰⁴. The pituitary gland is particularly sensitive to cdki expression levels. Indeed, loss of *p18^{INK4c}* leads to pituitary tumor formation; a characteristic shared by *p27^{Kip1}*

knockout and pRb heterozygous mice^{90,238,239,266}. However, disruption of both p18^{INK4c} and p27^{Kip1} lead to accelerated pituitary tumorigenesis suggesting role in two different pathways²⁶⁶. In absence of cdk4, pituitaries are hypoplastic but resistant to tumorigenesis induced by p18^{INK4c} loss confirming their function in the same pathway^{208,267}. The Cip/Kip family of cdk1 plays important roles at different levels of pituitary development and tumorigenesis. Simple p27^{Kip1} knockout does not present severe developmental defects but a global organomegaly suggesting an aberrant cell cycle control. These mice develop pituitary tumors^{238,240}, a function that is not dependent on cdk2 activity since p27^{Kip1}^{-/-} cdk2^{-/-} mice still develop tumors²⁴³. Mice invalidated for p21^{Cip1} do not develop pituitary tumors but its loss accelerates tumor development in pRb^{+/-} and p18^{INK4c}^{-/-} mice²³². The invalidation of p57^{Kip2} the last member of the Cip/Kip family, leads to pituitary hyperplasia caused by progenitors overproliferation (voir Chapitre 3). However, none of these mouse models specifically gives rise to corticotroph adenomas.

Corticotroph adenomas account for a minority of pituitary tumors but their presence is noteworthy. Corticotroph cells control the hypothalamo-pituitary-adrenals (HPA) axis and thus are important for homeostasis. Being the center of this axis, they integrate both CRH and glucocorticoids (Gc) signaling. CRH stimulates secretion of pre-synthesized POMC-derived ACTH and transcription of the POMC gene through a series of transcription factors and cofactors including Tpit, NGFI-B and SRC2^{77,91}. On the other hand, Gc binds their receptor (GR) and exert a negative feedback on the HPA axis by repressing POMC gene transcription through NGFI-B^{121,122}. Blood ACTH tightly regulates Gc levels produced and secreted by the adrenal glands that regulate many biological processes including inflammatory response, fat production and gluconeogenesis³³⁶. Hypocortisolism leads to Addison disease while hypercortisolism provokes Cushing syndrome which is characterized by upper body obesity (visceral fat), thin legs and arms and a decreased inflammatory response³⁰¹. Non-iatrogenic Cushing Syndrome is caused mostly (70%) by corticotroph adenomas (known as Cushing disease). Recently, we have shown that trans-repression of POMC by GR is dependent on the presence of two proteins, Brg1 and HDAC2³³⁷. In

Cushing disease, the tumor cells are resistant to Gc feedback and often aberrantly misexpress Brg1 and/or HDAC2³³⁷. This report work provided the first insight into the molecular mechanism of Gc resistance. However, we still do not understand the sequence of events leading to formation of a corticotroph adenoma.

In the present work, we identified important changes that corticotrophs undergo following embryonic differentiation. Mature corticotrophs express Cyclin D2; a phenomenon correlated with cell growth but not to proliferation. In Cushing disease, POMC-expressing cells proliferate and the majority of these tumors express Cyclin E but not p27^{Kip1}. Cyclin E expression was not sufficient to induce formation of corticotroph or melanotroph adenomas in the mouse but leads to POMC cell proliferation suggesting that cyclin E can re-enter differentiated cells in cycle and thus it could be a tumorigenesis predisposition factor.

4. RESULTS

4.1. POSTMITOTIC POMC CELLS GO THROUGH A MATURATION PROCESS

The high tumor frequency observed in the pituitary gland led us to investigate the expression of different cell cycle regulators in primitive and adult corticotroph cells. During mouse pituitary differentiation, the corticotroph cells are the first to appear around day e13 and they are marked by expression of the T-box transcription factor *Tpit*³⁵. Corticotroph cells are postmitotic since there is no overlap between phospho-histone H3 (pHH3) and POMC expression either at e13.5 or in the adult (Fig. 4.1A-C). These cells are also negative for BrdU incorporation (voir Chapitre 3). However, the portal system, which connects the hypothalamus to the pituitary, is established around day e16, and consequently brings numerous factors that could be associated with changes in cell physiology including cyclin expression. At e13.5, the primitive corticotroph cells do not express Ki67 or cyclin D1, D2 and E (Fig. 4.1D, E, H, I), three regulators of the G1 and S phases²⁰³, but express cyclin D3 (Fig. 4.1L). However around day e17.5, corticotroph cells start to express cyclin D2 (Fig. 4.1F), an expression that is maintained throughout adulthood (Fig. 4.1G). In the adult gland, corticotroph cells express cyclin D2 and to a lesser extent cyclin D3 (data not shown) but never cyclin E (Fig. 4.1J, K). Similar results were obtained for cyclin D1 as for cyclin D2 (data not shown). The expression D-cyclins in differentiated cells has been previously associated with cell growth³³⁸. Indeed, D-cyclins expression could initiate or be part of a maturation process taking place in corticotroph cells. Accordingly, cyclin D2 expression correlates with an increase in cell size between primitive (e13.5) and adult (6 months) stages (Fig. 4.1M). Taken together, these results establish different developmental cell populations (Fig. 4.1N) and suggest that normal POMC cells are postmitotic but undergo a maturation process between early development and adulthood giving rise to mature POMC cells expressing G1 regulatory D-cyclins.

4.2. DIFFERENTIATED POMC CELLS PROLIFERATE IN CUSHING DISEASE

In the normal pituitary, postmitotic corticotrophs are dispersed within the anterior lobe. However in Cushing disease, the adenoma contains a homogenous population of corticotrophs^{302,337}. Two mechanisms could explain the tumorigenic process: 1) undifferentiated tumor cells (similar to the putative cancer stem cell) proliferate and then differentiate and/or 2) differentiated corticotrophs re-enter the cell cycle and proliferate. The main difference between these two theories is the differentiation level of the proliferating cells. Having shown that POMC cells expressed G1 associated D-cyclins (Fig. 4.1), we hypothesized that they could proliferate in Cushing disease. In order to address this hypothesis directly, we performed co-staining for pHH3 and POMC on human corticotroph adenoma sections. Corticotroph adenomas are usually slow growing tumors³³⁹ and accordingly, we only found a small number of pHH3-positive cells in these adenomas (Fig. 4.2A, B). Nonetheless, these dividing cells all co-express POMC indicating that corticotrophs proliferate in corticotroph adenomas (Fig. 4.2A, B). Thus, differentiated POMC cells have the potential to reenter the cell cycle and become tumorigenic.

4.3. BRG1 AND HDAC ACTIVITY CONTROL CYCLIN E EXPRESSION

In a previous report, we correlated aberrant expression of Brg1 and HDAC2 with Cushing disease³³⁷. Brg1 is a potential tumor suppressor since Brg1+/- mice develop spontaneous tumors²⁹⁵ and data suggest that Brg1 may repress cyclin E expression³⁴⁰. In order to verify if Brg1 can control cyclin E expression in corticotroph cells, we performed an RNAi knockdown of Brg1 in AtT-20. The RNAi efficiently reduced Brg1 protein level and lead to an increase in cyclin E expression (Fig. 4.3A).

The HDAC2 gene invalidation did not lead to tumor formation³⁴¹. However, HDACs have been previously associated with cell cycle regulation^{85,342} and there may be redundancy between different HDACs. To investigate whether the loss of HDAC function leads to cyclin E expression, we treated AtT-20 cell with the HDAC inhibitor valproic acid (VPA). After 24 or 48 hours of treatment, VPA

increased cyclin E protein level (Fig. 4.3B). These data suggest that the loss of Brg1 and/or HDAC activity in corticotroph cells resulting in cyclin E expression may trigger proliferation and contribute to adenoma formation.

4.4. EXPRESSION OF CYCLIN E AND LOSS OF P27^{KIP1} CORRELATE WITH CUSHING DISEASE

The mature corticotroph cells express the D-cyclins (Fig. 4.1D and data not shown) necessary for G1 progression; however they do not express cyclin E (Fig. 4.1K) which is required for G1-S transition²¹¹. Having shown that Brg1 and HDAC activity control cyclin E protein levels (Fig. 4.3), we analyzed a panel of 19 patients with Cushing disease for their relative expression of cyclin E. In these tumors, the Tpit transcription factor is a marker of corticotroph adenomas^{302,337}. In Tpit-positive tumors (Fig. 4.4A, D), we found cyclin E expression in 11 (58%) samples (Fig. 4.4E, G) while 8 (44%) were negative (Fig. 4.4B, G). Thus, cyclin E expression could be associated with proliferation in Cushing disease. In agreement with Brg1 siRNA data, all tumors with an aberrant expression of Brg1 expressed cyclin E (Fig. 4.1G). The cdki p27^{KIP1} is known to inhibit cyclin E/cdk2 complex activity²⁰⁴ and its expression is associated with differentiation in the developing pituitary and maintained throughout adulthood (voir Chapitre 3). We hypothesized that, associated with cyclin E expression, a p27^{KIP1} loss could enhance cell proliferation and occur in Cushing disease. p27^{KIP1} expression was detected in 9 tumors (47%) (Fig. 4.4C) while loss occurred in 10 (53%) (Fig. 4.4F, G). Interestingly, the majority (8/11, 74%) of cyclin E-positive tumors do not express p27^{KIP1} (Fig. 4.4H). Even if p27^{KIP1}^{-/-} mice develop POMC-expressing adenomas²⁴⁰, no mutation was found in Cushing disease²⁴⁴. Expression of cyclin E combined to a p27^{KIP1} loss could thus be an early event in the tumorigenic process.

Having shown that tumorigenic POMC cells proliferate (Fig. 4.2) and knowing that cyclin E is essential for cell cycle reentry after leaving a quiescent state^{211,214}, we postulated that POMC cells need cyclin E to leave their postmitotic state. In order to test this hypothesis, we looked for the presence of

POMC proliferative cells in corticotroph tumors expressing or not cyclin E (Fig. 4.2A, B). The proliferating status of POMC cells is not strictly dependent on cyclin E expression and/or p27^{Kip1} loss: indeed, POMC cells proliferate in cyclin E-negative, p27^{Kip1}-positive (Fig. 4.2A) as they do in cyclin E-positive, p27^{Kip1}-negative tumors (Fig. 4.2B). Taken together, our results suggest that the cyclin E/p27^{Kip1} pathway is a potential regulator of corticotroph proliferation, but other pathways are also involved.

4.5. EXPRESSION OF CYCLIN E TRIGGERS POMC-EXPRESSING CELL PROLIFERATION

In order to test directly if cyclin E is sufficient to force corticotrophs into the cell cycle, we generated transgenic mice (Tg) overexpressing cyclin E under POMC promoter control (Fig. 4.5E). At e14.5, the primitive corticotroph cells (POMC+, Fig. 4.5A) do not express nuclear cyclin E and they are not proliferating since no Tpit-positive cell incorporate BrdU (Fig. 4.5C). In the Tg, cyclin E is strongly expressed in POMC-positive cells (Fig. 4.5B) but it is not sufficient to induce corticotroph proliferation as shown by the absence of co-localization between Tpit and BrdU (Fig. 4.5D). Pituitary tumorigenesis is a slow process, and cyclin E expression could be a predisposition factor. The IL is very sensitive to tumorigenesis and it is the first lobe to show signs of hyperplasia. By four months of age, no significant morphological differences were observed between WT and Tg pituitaries (Fig. 4.5G compared to F). However by 8 months, Tg mice start to show signs of hyperplasia in the IL (Fig. 4.5H compared to 5F). As these Tg mice will get older, we postulated that they may develop IL adenomas. In WT pituitaries, there is a small number of proliferating cells with stem cell potential that do not express any of the differentiation marker (¹⁴¹ and data not shown). In Tg mice overexpressing cyclin E, we found a few cells co-expressing POMC and pHH3 (Fig. 4.5J and K compared to I) as in Cushing disease (Fig. 4.2). Our results suggest that cyclin E expression may predispose to corticotroph proliferation, but its effect is somehow limited.

5. DISCUSSION

The present study correlated cyclin gene expression with different post-differentiation processes in corticotroph cells. First, the primitive postmitotic corticotrophs undergo a maturation process correlated with expression of Cyclin D2 and D1 during normal development (Fig. 4.7A). Second, in the pathologic context of Cushing disease, corticotroph cells proliferate to give rise to ACTH-secreting adenomas (Fig. 4.2 and 4.4). Expression of cyclin E, possibly associated with a p27^{Kip1} loss, could be one of the pathways involved in corticotroph tumorigenesis (Fig. 4.7B).

5.1. REACHING MATURE STAGE

Early in development, corticotroph cells are exposed to many signals coming from surrounding tissues. These signals orchestrate precursor proliferation and differentiation. For example, Wnt signaling converges on the Pitx2 transcription factor which is expressed from early pituitary development until the adulthood, to control cyclin D2 expression¹⁴⁵. When the portal system connects the hypothalamus with the pituitary at around e16, new factors can now affect pituitary physiology and specifically corticotroph cells. For instance, leukemia inhibitory factor (LIF) affects POMC transcription by activating STAT3 in corticotroph cells³⁴³. This signaling cascade has been implicated in cyclin D2 and D3 expression³⁴⁴. Furthermore, the NGFI-B family of orphan nuclear receptors, mediators of the CRH response and POMC transcription⁷⁶, has also been associated with cyclin D1 and D2 expression³⁴⁵. As POMC transcription⁷⁷, expression of cyclin D2 is dependent on PKA activation³⁴⁶. Thus, factors regulating cyclin D2 also participate to the CRH response of POMC promoter and therefore, maturation and hormonal response could be linked processes in corticotrophs.

5.2. CYCLIN E EXPRESSION, A STEP TOWARD TUMORIGENESIS

The control of G1-S transition is of tremendous importance in cell cycle regulation. Since mature corticotrophs express cyclin D2 and D3, an upregulation

of cyclin E could be sufficient to activate the cell cycle. In fact, cyclin E expression is essential for reentering the cell cycle coming from the quiescent state²¹¹, a function that is assumed independently of cdk activity²¹⁴. Thus, cyclin E expression could be required for mature POMC cells to leave their postmitotic state and enter S phase.

If cyclin E expression is a primary event leading to corticotroph tumorigenesis, its regulation must be strict. Many protein complexes regulate cyclin E expression; to repress its transcription, E2F4 recruits p107, HDAC and the methyl transferase PRMT5^{347,348}. In corticotroph cells, Brg1 and HDAC activity repress cyclin E expression (Fig. 4.3). The aberrant expression of Brg1 and HDAC2 in human corticotroph adenomas³³⁷ could contribute to cyclin E expression and tumor formation. Indeed, it could be the link between hormonal resistance and the presence of a corticotroph adenoma in Cushing disease. Currently, HDAC inhibitors are part of multiple clinical trials for cancer treatment. The findings that such inhibitors control cyclin E expression and therefore G1-S transition should be taken into account.

5.3. DIFFERENTIATED *VERSUS* UNDIFFERENTIATED TUMOR CELLS

Recent advances in stem cells and tumors biology lead to the hypothesis of putative cancer stem cells. According to this model, a small number of undifferentiated precursor cells proliferate and give rise to the tumor. Our results suggest that this is not the case in Cushing disease, since we found that all detectable proliferating cells are POMC-positive (Fig. 4.2). Even if we cannot exclude that the primary event occurred in an undifferentiated precursor, our results indicate that a differentiated POMC-expressing can enter the cell cycle upon cyclin E expression (Fig. 4.5). It is clear however that cyclin E expression is not sufficient to generate adenomas. p27^{Kip1}, the main inhibitor of cyclin E/cdk2 complex²⁰⁴, is normally expressed in mature POMC cells (voir Chapitre 3). Conditional inactivation of p27^{Kip1} in POMC-expressing cells led to formation of IL adenomas suggesting the proliferation of differentiated cells³⁴⁹. Having found a correlation between cyclin E expression and p27^{Kip1} loss in human corticotroph

adenomas (Fig. 4.4H), we think that the cyclin E/p27^{Kip1} balance regulates corticotroph and melanotroph proliferation. Expression of p27^{Kip1} is found at different levels in all differentiated pituitary cells (data not shown) and indeed, could act as a gatekeeper to protect them from cycling.

Loss of p18^{INK4c} in the mouse also leads to IL adenomas but it affects a different pathway than p27^{Kip1} since p18^{INK4c}^{-/-}, p27^{Kip1}^{-/-} mice develop pituitary tumors at higher rate^{90,266}. An interesting possibility is that pRb and p18^{INK4C} are in the same pathway controlling POMC precursor proliferation. Indeed, a perturbation in this pathway may lead to clonal expansion of precursors and formation of POMC-expressing adenomas. In agreement with this model, p27^{Kip1}^{-/-} and pRb^{+/-} IL tumors were found to be respectively poly- and monoclonal neoplasms³⁵⁰. Thus, two different mechanisms could give rise to corticotroph or melanotroph adenoma. The status of proliferating cells, as well as expression of cell cycle regulators, will need to be addressed in the context of other mouse models and human pituitary tumors.

6. MATERIALS AND METHODS

6.1. GENERATION OF TRANSGENIC MICE

The mouse cyclin E1 cDNA was inserted downstream of the 543 nucleotides of POMC promoter²⁰. Transgenic mice were generated as described³³. Pregnant females were injected with BrdU 100mg/kg 1h before embryos were recovered by caesarian at day e14.5. Alternatively, adult transgenic mice were killed at the indicated time. For genotyping, primers 5-GAACTAGGCCTGCCTCACAC-3' (POMC) and 5'-AGGGCTGACTGCTATCCTCGCTTT-3' (cyclin E) were used.

6.2. TISSUE PREPARATION AND IMMUNOFLUORESCENCE

Embryos were fixed, embedded in paraffin and treated as previously described^{150,153}. Human corticotroph adenomas samples were previously described³³⁷. The following antibodies were used : phospho-histone H3 (Upstate, No. 06-570), BrdU (DSHB, G3G4), Tpit³⁵, Cyclin E (Santa Cruz, M-20), Cyclin D1 (BD Biosciences, No. 556470), Cyclin D2 (Santa Cruz, M-20), Cyclin D3 (Lab Vision, Ab-1), Ki67 (Lab Vision, Ab-5), p27^{Kip1} (BD Biosciences, No. 610241), POMC (Cortex Biochem, CR1096M), Brg1 (Chemicon, MAB3452) and HDAC2 (Upstate No. 05-814). Secondary antibody detection was achieved by immunofluorescence with Alexa-conjugated antibodies or using biotin-conjugated antibodies followed by Alexa-conjugated (Invitrogen, Molecular Probes) or HRP-conjugated (Perkin Elmer) streptavidin.

6.3. CELL CULTURE, SIRNA AND WESTERN BLOT

AtT-20 culture conditions, Brg1 siRNA and valproic acid treatment were previously described³³⁷. For Western blotting, the following antibodies were used: Brg1 (Chemicon), HDAC2 (Upstate), GAPDH (Abcam) and cyclin E (Santa Cruz, M-20).

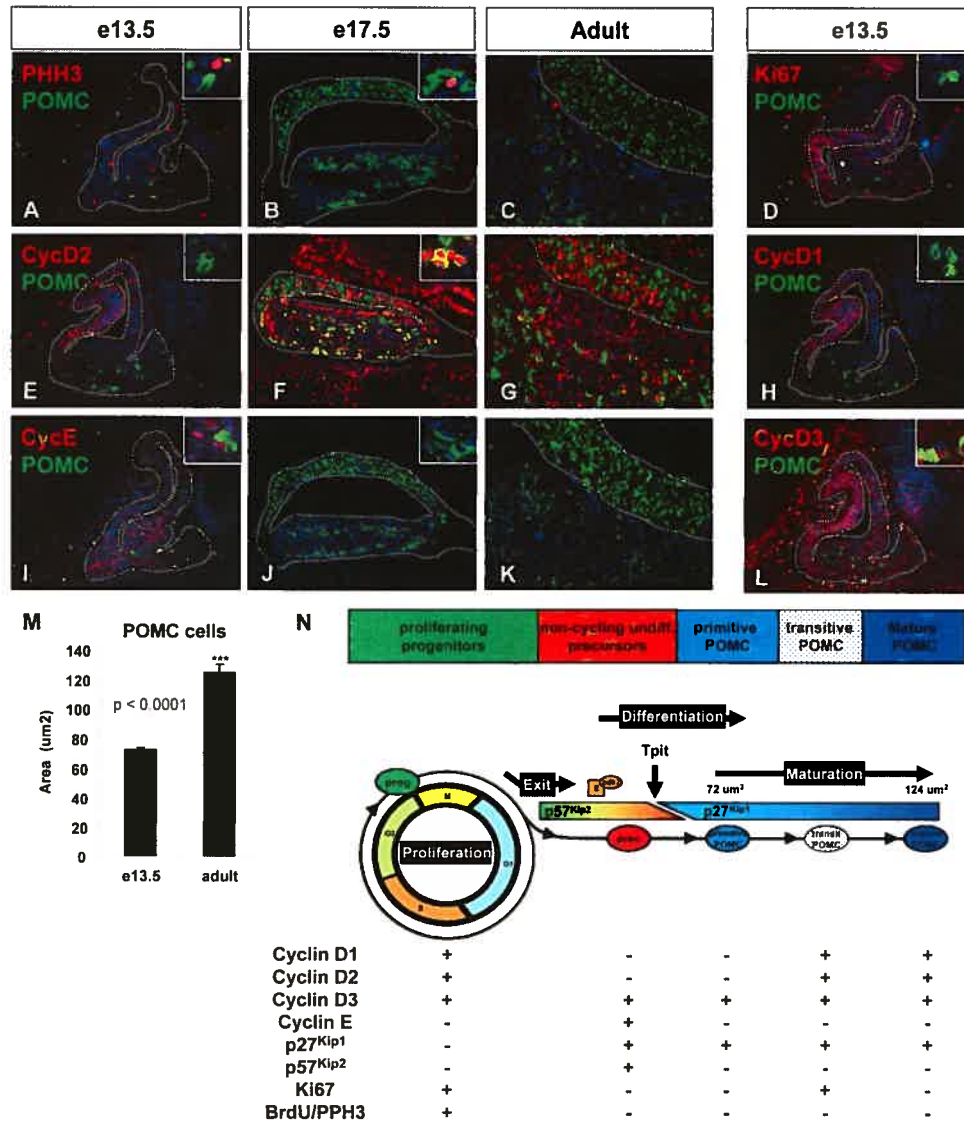


Figure 4.1. Corticotroph cells undergo a maturation process.

Co-immunofluorescence of e13.5, e17.5 and adult pituitaries for different cell cycle regulators. pHH3 (red), a mitosis marker, reveals proliferating cells mostly around the lumen at e13.5 (A) while POMC-expressing cells (green) appear ventrally. At e17.5 (B) and in adult glands (C), the IL is constituted mostly of melanotrophs while corticotrophs are dispersed in the AL. There is no overlap with pHH3 showing that corticotroph cells are postmitotic. Ki67 (D), cyclin D2 (E) and cyclin D1 (H) are expressed in the progenitor domain around the lumen at e13.5 and excluded from differentiated cells. Around e17.5, cyclin D2 starts to be expressed in POMC cells (F) and it is maintained in the adult gland (G). Another member of the cyclin D family, cyclin D3 is expressed in proliferating and differentiated cells (L). Expression of cyclin E is never found in differentiated POMC cells (G-K). (M) Corticotroph cells go through a maturation process between e13.5 and adulthood characterized by an increase in cell volume (assessed by cross-section area at nuclear level). In summary, expression of cell cycle regulators reveals the existence of different cell populations (N). Following cell cycle exit, progenitors enter the differentiation pathway marked by Tpit and p27^{Kip1} in primitive POMC cells. Then, after establishment of the portal system, POMC cells express Ki67 transiently and cyclin D2 to give rise to a mature D-cyclins-expressing POMC cells.

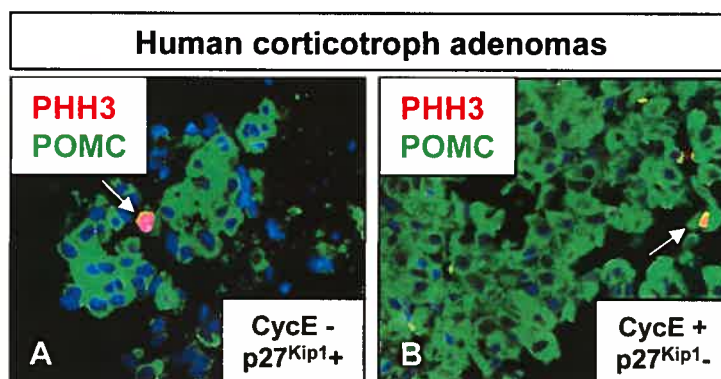
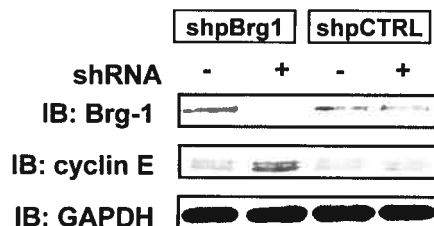


Figure 4.2. Corticotroph cells proliferate in Cushing disease.

Identification of proliferating cells using pHH3 and POMC in human corticotroph adenomas. (A, B) The co-labeling of pHH3 with POMC showed proliferation of differentiated cells. (A) Cyclin E-negative, p27^{Kip1}-positive tumor. (B) cyclin E-positive, p27^{Kip1}-negative.

A RNA interference against Brg1



B Valproic acid (HDAC inhibitor)

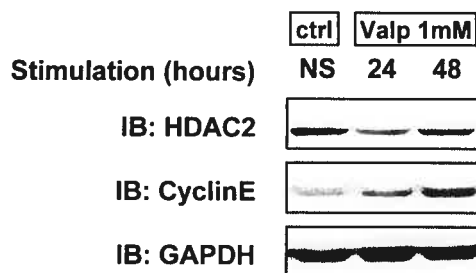
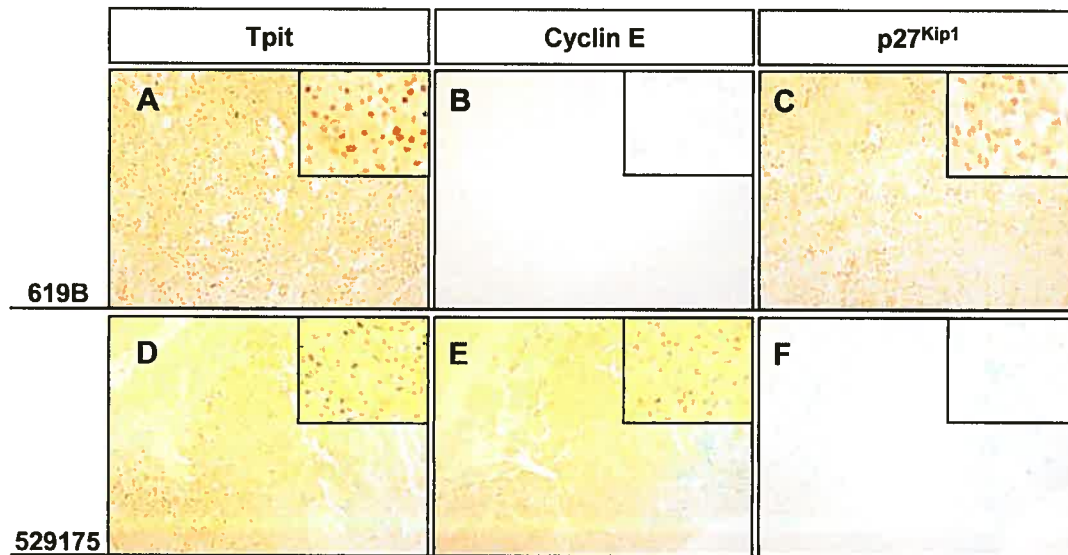


Figure 4.3. Brg1 and HDAC activity regulates cyclin E expression.

Western blot analysis of cyclin E expression following AtT-20 treatment with RNAi against Brg1 or with the HDAC inhibitor valproic acid (VPA). (A) Downregulation of Brg1 by RNAi led to an increase in cyclin E protein levels. (B) Treatment of AtT-20 with VPA for 24 or 48 hours upregulated cyclin E expression.



G Human corticotroph adenomas (n=19)

	n	Cyclin E		p27 ^{Kip1}	
		+	-	+	-
No/Low/Cyt Brg1	5	5	0	2	3
No/Low HDAC2	3	2	1	1	2
Normal	11	4	7	6	5
Total	19	11	8	9	10

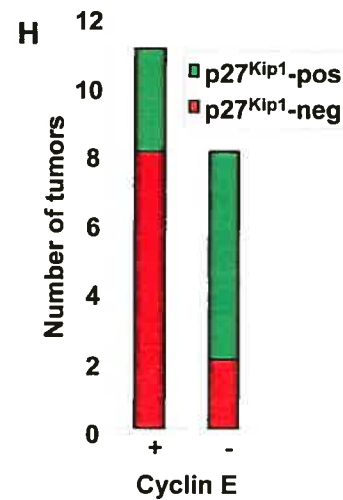


Figure 4.4. Cyclin E and p27^{Kip1} expression in Cushing disease.

Immunohistochemical analysis of corticotroph marker TPIT (A, D), cyclin E (B, E) and p27^{Kip1} (C, F) in representative corticotroph adenomas. Tumor tissue is revealed by nuclear staining for TPIT (A, D). Adenomas were found to have differential expression of cyclin E (B, E) and p27^{Kip1} (C, F). (G-H) Summary of cyclin E and p27^{Kip1} expression in 19 patients with Cushing disease. Overall, 11 of 19 tumors overexpress cyclin E while 8 out of this 11 do not express p27^{Kip1}. On the other hand, 8 of 19 patients have no cyclin E expression while only 2 of 8 do not express p27^{Kip1}.

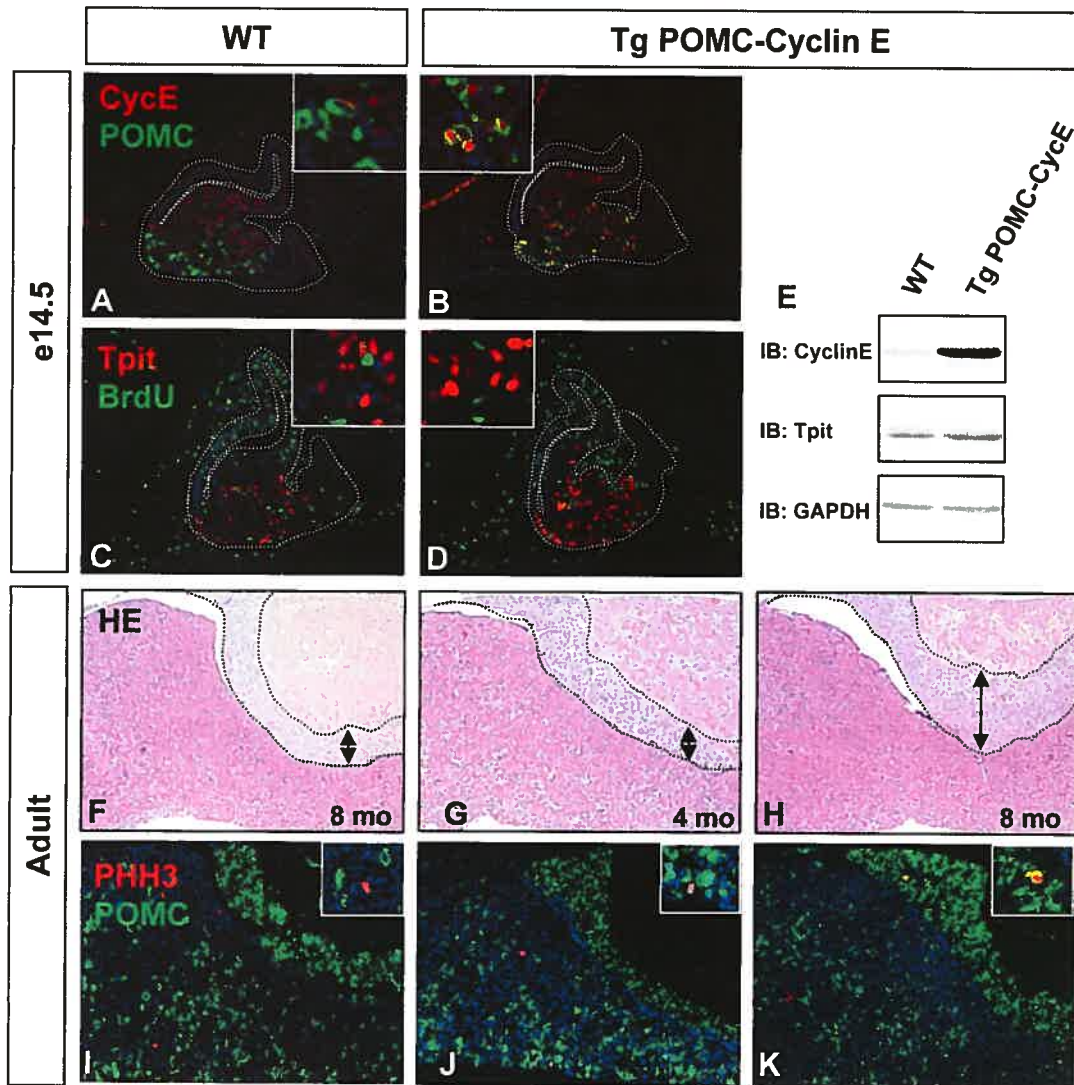


Figure 4.5. Cyclin E induces corticotroph proliferation but is not sufficient for corticotroph adenoma formation.

A transgene (Tg) for cyclin E expression under control of the POMC promoter specifically targets corticotrophs and melanotrophs. (A, B) Expression of cyclin E in POMC-expressing cells at e14.5. No colocalisation between Tpit and BrdU in WT (C) and Tg (D) mice suggesting that cyclin E is not sufficient to induce corticotroph proliferation. (E) Expression of cyclin E in the adult pituitary gland. At 4 months, Tg pituitaries do not show sign of hyperplasia (G compared to F) while at 8 months, the IL is slightly hyperplastic (H compared to F). However, in Tg pituitaries, we found POMC-positive, pHH3-positive cells (J and K compared to I) suggesting that some corticotrophs and melanotrophs are induced to proliferate under cyclin E over-expression.

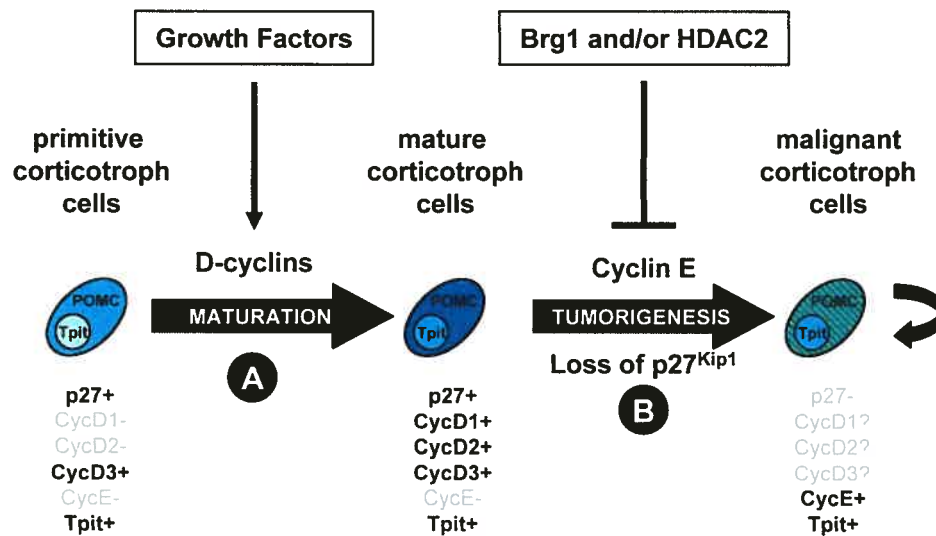


Figure 4.6. Maturation and tumorigenesis in corticotrophs.

The present study identified post-differentiation events occurring in corticotroph cells. First, primitive POMC-expressing cells are postmitotic and do not express many cell cycle regulators. Then, these cells undergo a maturation (A) process that increases cell volume and is associated with cyclin D1/D2 expression. (B) In Cushing disease, corticotroph cells start to proliferate (B). The loss of Brg1 and/or HDAC2 leads to cyclin E upregulation in corticotroph cells. The presence of cyclin E is sufficient to induce corticotroph proliferation and is possibly the first, but not the only, step toward tumor development in Cushing disease.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to many colleagues from the laboratory for comments. The excellent work of Annie Vallée and Julie D'Amours, respectively for tissue preparations and animal maintenance, is acknowledged. The expert secretarial assistance of Lise Laroche was greatly appreciated. This work was supported by fellowships from *Fonds des chercheurs et aide à la recherche-Fonds de la recherche en santé du Québec* (FCAR-FRSQ) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to SB, and by research grants to JD from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and National Cancer Institute of Canada (NCIC).

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Au cours des précédents chapitres, différents aspects du développement normal, de la tumorigénèse et de la réponse hormonale hypophysaires ont été abordés. Les présents travaux nous permettent de mieux comprendre ces aspects de la biologie des cellules corticotropes. Ces travaux ont élucidé la séquence développementale pour la différenciation des cellules corticotropes, ont identifié des protéines essentielles pour la réponse hormonale et ont défini des mécanismes pour la prolifération aberrante de ces mêmes cellules.

1. L'ÉTABLISSEMENT DE LA LIGNÉE CORTICOTROPE

Le développement hypophysaire est contrôlé par plusieurs morphogènes et facteurs de transcription menant à cinq types cellulaires distincts. La sortie du cycle cellulaire des progéniteurs non-différenciés est assumée par l'expression de p57^{Kip2} (voir Chapitre 3). Les cellules marquent par la suite une pause en attente de l'information nécessaire à leur différenciation, en l'occurrence Tpit pour les lignées corticotrope et mélanotrope. Suite à la différenciation, les cellules subissent un processus de maturation qui les mène à jouer leur rôle central au sein de l'axe HPA. La transition entre ces différentes étapes est certainement assujettie à une régulation stricte par différentes voies de signalisation et facteurs de transcription.

1.1. LES PROGÉNITEURS HYPOPHYSAIRES

La présence d'un progéniteur hypophysaire unique ou de progéniteurs spécifiques à chacune des lignées n'a jamais été démontrée. Cependant, plusieurs indices suggèrent qu'un même progéniteur peut donner naissance à plusieurs types cellulaires. Par exemple, dans les hypophyses Tpit^{-/-}, alors que la différenciation des cellules POMC est bloquée, nous observons l'apparition de cellules gonadotropes ainsi que thyrotropes là où il n'y a normalement que des cellules mélanotropes¹⁹⁷. Ces résultats suggèrent l'existence d'un progéniteur

commun capable de donner naissance à trois lignées cellulaires distinctes (mélanotropes, gonadotropes et thyrotropes).

1.1.1. LA VOIE NOTCH

Notch, un signal important lors du développement embryonnaire de l'hypophyse, est impliqué dans le contrôle de la prolifération^{140,143}. Il est important de noter qu'il ne s'agit pas d'un morphogène qui diffuse librement dans le tissu. Cette signalisation nécessite un contact entre deux cellules puisque l'une présente le ligand et l'autre arbore le récepteur (Notch)¹³⁹.

Au niveau hypophysaire, l'invalidation de la voie de signalisation Notch mène à la perte des lignées Pit1-dépendantes au profit des cellules corticotropes¹⁴³. Hes1, un effecteur de la voie Notch, colocalise avec le BrdU dans la majorité des cellules, mais il existe une population de cellules BrdU+, Hes1- (résultats non montrés). Nous pouvons supposer que ces progéniteurs Hes1+, BrdU+ soient les précurseurs des lignées Pit1-dépendantes tandis que les BrdU+, Hes1- soient à l'origine des lignées corticotropes, mélanotropes et gonadotropes puisque l'invalidation de la voie Notch bloque l'apparition des lignées Pit1-dépendantes¹⁴³. En d'autres termes, ces données suggèrent l'existence de différents progéniteurs prolifératifs.

1.1.2. LES MORPHOGÈNES CLASSIQUES

Le positionnement des cellules prolifératives du côté dorsal de la glande en développement suggère qu'elles sont sous l'influence d'un gradient de morphogène émergeant du diencephale. Les FGFs correspondent à ces critères et sont impliqués dans la prolifération des progéniteurs hypophysaires¹²³. La présence de morphogènes de la famille des FGFs, associée à la voie Notch qui fait intervenir le contact cellule/cellule permettraient de contrôler la prolifération et d'associer les cellules en réseaux. Les divisions cellulaires s'effectuent majoritairement du côté dorsal de la glande tandis que les cellules différenciées commencent à apparaître de côté ventral (Fig. 3.1). Ainsi, suite à la mitose, les cellules filles pourraient être repoussées ou attirées du côté ventral de la glande.

La présence de la voie Notch permettrait de maintenir la prolifération et de garder le contact entre ces cellules. Puisque la différenciation suit un gradient inverse à celui de la prolifération, une source de morphogène du côté ventral de la glande en développement pourrait induire la différenciation. Le gradient ventral-dorsal de BMP2 pourrait jouer ce rôle, car les cultures d'explants ont montré que sa présence induit la différenciation ¹²³. S'il est vrai que les progéniteurs hypophysaires prolifératifs sont déjà spécifiés, alors il ne manque que les signaux pour réguler la transition prolifération/différenciation.

1.1.3. LE DEGRÉ DE PLASTICITÉ

Le modèle de différenciation hypophysaire proposé il y a quelques années (Fig. 1.5) est basé sur l'existence d'une cellule précurseur unique qui se différencie pour donner les différentes lignées hypophysaires ¹⁹⁷. Cependant, les évidences suggèrent l'existence de plusieurs progéniteurs présentant des degrés de spécification différents. Ainsi, un seul programme serait nécessaire pour contrôler l'expansion des progéniteurs, ce qui est plus simple d'un point de vue mécanistique. Les progéniteurs spécifiés partageraient les mêmes signaux de prolifération, d'arrêt du cycle cellulaire et d'entrée en différenciation. Néanmoins, les hormones (les marqueurs les plus terminaux de différenciation) apparaissent de façon séquentielle lors du développement hypophysaire ³⁵¹. Cette observation peut s'expliquer par des vitesses de différenciation propres à chacune des lignées.

Pour l'instant, le degré de plasticité des progéniteurs prolifératifs est inconnu. Personne n'a réussi à isoler des cellules hypophysaires et à les diriger dans une voie de différenciation particulière. Le développement de nouveaux outils permettant la purification de ces cellules progéniteurs (par exemple, à l'aide d'une souris transgénique promoteur cycline A-GFP) et leur mise en culture permettra peut-être de mieux comprendre le degré de plasticité de ces cellules.

1.2. LA TRANSITION DE LA PROLIFÉRATION VERS LA DIFFÉRENCIATION

Pour entrer dans la voie de différenciation, les progéniteurs doivent quitter le cycle cellulaire actif. Dans les cellules de mammifères, plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire peuvent participer à ce processus (voir Chapitre 1, section 4.1.2). Au niveau hypophysaire, la transition de la phase proliférative vers la différenciation est assurée par $p57^{Kip2}$ (voir Chapitre 3), car les cellules qui l'expriment cessent de proliférer (Fig. 3.2). L'induction de $p57^{Kip2}$ est indépendante des signaux de différenciation puisqu'en absence de *Tpit*, les cellules demeurent au stade non-différencié, mais expriment $p57^{Kip2}$ (Fig. 3.6). La sortie du cycle cellulaire est un passage obligé vers la différenciation puisque aucune cellule différenciée ne prolifère (Fig. 3.4).

1.2.1. LA FONCTION DE $P57^{KIP2}$

Nous ne savons pas si tous les types cellulaires hypophysaires passent par le stade $p57^{Kip2}$. L'étude des hypophyses *Tpit*^{-/-} a confirmé que c'est le cas pour les mélanotropes, corticotropes et gonadotropes. Cependant, il existe d'autres modèles de souris qui montrent des défauts de différenciation hypophysaire. Par exemple, l'inactivation de *Prop1* et *Pit1* mènent à l'absence des lignées somatotropes, lactotropes et thyroïdotropes^{170,184,185}. *Prop1* pourrait être nécessaire à l'induction de $p57^{Kip2}$ ce qui expliquerait la prolifération aberrante dans les hypophyses *Prop1*^{-/-}¹⁷². Contrairement à *Prop1*, la perte de *Pit1* interfère seulement avec la différenciation terminale, tout comme *Tpit*. L'inactivation de *Pit1*, comme celle de *Tpit*, mènerait donc à un blocage des cellules au stade $p57^{Kip2}$ -positif, non-prolifératif et non-différencié. À la lumière de nos résultats, différents modèles de souris devront être réanalysés pour l'expression de $p57^{Kip2}$. Si nous retrouvons un blocage au stade $p57^{Kip2}$ -positif (par exemple, en absence de *Pit1*), nous pourrions généraliser son rôle à la sortie du cycle cellulaire de toutes les lignées hypophysaires.

Durant le développement hypophysaire, deux isoformes de $p57^{Kip2}$ sont exprimés. $p57^{Kip2\alpha}$ est l'isoforme décrit qui comporte 4 exons menant à la synthèse d'une protéine de 335 acides aminés. Lors du sous-clonage à partir

d'ADNc d'hypophyses à e14.5, j'ai identifié p57^{Kip2} β qui a une séquence identique à p57^{Kip2} α à l'exception de 36 nucléotides en plus à la fin de l'exon 2. Ce nouvel isoforme représente 20% des clones obtenus, mais nous ne savons pas s'il joue le même rôle que p57^{Kip2} α dans la sortie du cycle cellulaire. Malheureusement, nous ne possédons pas d'anticorps permettant de distinguer ces deux isoformes. Si l'expression des deux isoformes est mutuellement exclusive, il se pourrait que p57^{Kip2} α et β soient associés à des stades précoces du développement de lignées hypophysaires spécifiques.

1.2.2. LA RÉGULATION DE P57^{KIP2}

Il existe plusieurs régulateurs potentiels de p57^{Kip2}. Au niveau du pancréas, un organe endocrine comparable à l'hypophyse, le répresseur transcriptionnel Hes1 réprime son expression²⁵⁷. Ce facteur est sous contrôle de la voie de signalisation Notch, qui lorsque invalidé provoque une différenciation précoce des cellules corticotropes. Ces cellules corticotropes précoces ne prolifèrent pas ce qui s'expliquerait bien par une expression hâtive de p57^{Kip2} dans les progéniteurs de la lignée corticotrope. L'inactivation de la voie Notch dans le progéniteur mènerait à une diminution de l'expression de Hes1¹⁴³. Ainsi, la répression de l'expression de p57^{Kip2} serait levée et permettrait la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation hâtive.

La voie Notch peut réprimer l'expression de p57^{Kip2}. En contrepartie, il existe forcément un mécanisme capable d'activer la transcription qui justifie le niveau élevé de l'ARNm de p57^{Kip2}. Le locus du gène p57^{Kip2} est soumis à l'empreinte génétique ce qui fait en sorte que seulement l'allèle maternel est exprimé dans la progéniture²⁵¹. Une étude récente de Varrault *et al* a mis en évidence le rôle de Zac1, un facteur de transcription à doigts de zinc, dans le contrôle de l'empreinte génétique lors du développement³⁵². À l'origine, Zac1 a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules AtT-20³⁵³, le modèle de cellules corticotropes. De plus, la perte d'expression de Zac1 est associée aux adénomes hypophysaires non-fonctionnels³⁵⁴ ce qui laisse présager une augmentation de la prolifération au niveau des progéniteurs non-différenciés. Parmi les gènes régulés par Zac1,

nous retrouvons p57^{Kip2} (cdkn1c). Nous pouvons spéculer que les souris Zac1^{-/-} tout comme les p57^{Kip2}^{-/-} (si elles étaient viables) développeraient des adénomes non-fonctionnels à long terme. Les souris invalidées pour le gène Zac1 n'ont malheureusement pas encore été étudiées pour un phénotype hypophysaire.

En résumé, au niveau des progéniteurs prolifératifs, Hes1 réprimerait l'expression de p57^{Kip2} qui par la suite serait activée par Zac1 dans la population en voie de différenciation. Cependant, p57^{Kip2} n'est pas exprimé dans l'hypophyse adulte (Fig. 3.6) malgré une forte expression de Zac1^{353,355}. Par conséquent, si Zac1 est l'activateur, un répresseur présent dans les cellules différenciées est nécessaire pour venir éteindre l'expression de p57^{Kip2}. Ce facteur pourrait bien être une cible transcriptionnelle de Tpit, mais aussi de SF1. En absence de Tpit, la répression de p57^{Kip2} ne se fait pas dans les cellules non-différenciées (Fig. 3.6). Toutefois, si elles se différencient en gonadotropes (SF1-positives), l'expression de p57^{Kip2} s'éteint (Fig. 3.6). Les approches d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'une hybridation sur micropuces (ChIP-on-chip) de Tpit et SF1 permettront peut-être d'identifier ce facteur commun à ces deux lignées.

1.2.3. LA POPULATION DE PRÉCURSEURS NON-PROLIFÉRATIFS ET NON-DIFFÉRENCIÉS

D'un point de vue développemental, cette population p57^{Kip2}-positive contient la clé de l'énigme de la différenciation. En effet, p57^{Kip2} est le premier marqueur identifié à ce jour de l'état de transition entre les stades prolifératif et différencié. La purification de cette population de cellules à l'aide de la séquence promotrice de p57^{Kip2}²⁶⁰ permettrait l'identification d'autres facteurs pro-différenciation. Outre Tpit, nous ne connaissons aucun régulateur de la différenciation corticotrope. La présence d'une population de cellules p57^{Kip2}-positives dans les hypophyses Tpit^{-/-} permet de poser la question plus directement sur ces régulateurs. En effet, les cellules βgal⁺, p57^{Kip2}⁺ démontrent que les facteurs de transcription nécessaires à l'expression du locus de Tpit sont présents. La comparaison des profils d'expression des populations p57^{Kip2}-positives

développementale avec celle des souris *Tpit*^{-/-} pourraient révéler les régulateurs transcriptionnels spécifiques de *Tpit*.

1.2.4. LA FONCTION DE LA CYCLINE E

Au cours du Chapitre 3, j'ai identifié un second facteur exprimé lors de la transition prolifération/différenciation, soit cycline E. La fonction *in vivo* de cette protéine est intrigante puisque les souris cycline E1/E2 ^{-/-} ont révélé l'indépendance du cycle cellulaire sur la présence de ces cyclines ²¹¹. La meilleure hypothèse est que ce facteur joue un rôle dans l'identité cellulaire d'une ou plusieurs des lignées hypophysaires. Cette théorie est supportée par les études chez la drosophile où cycline E est nécessaire et suffisant pour induire la spécification des neuroblastes thoraciques ³²⁹. En fait, cycline E s'exprime de façon asymétrique pour générer des cellules neuronales et gliales ³²⁹. Au niveau hypophysaire, la situation pourrait être semblable. Par exemple, un précurseur qui aurait à choisir entre devenir une cellule corticotrope ou gonadotrope pourrait utiliser un tel mécanisme. En fait, dans l'hypophyse adulte, nous détectons une forme de cycline E cytoplasmique dans les cellules gonadotropes (résultats non montrés). La population cycline E-positif durant le développement embryonnaire est probablement celle engagée dans la voie de différenciation gonadotrope.

1.3. LA MATURATION DES CELLULES CORTICOTROPES

À la suite de la prolifération et la sortie du cycle, les cellules corticotropes et mélanotropes nécessitent la présence de *Tpit* pour effectuer leur différenciation terminale qui culmine avec l'expression de POMC. Toutefois, l'obtention d'une cellule corticotrope mature et fonctionnelle ne se fait pas au jour embryonnaire e13.5. Le système porte qui relie l'hypothalamus et l'hypophyse se met en place au jour e15.5. À ce moment, plusieurs hormones, cytokines et facteurs de croissance font leur entrée dans la glande. Mes résultats démontrent que les cellules corticotropes augmentent considérablement leur volume entre le jour e13.5 et l'âge adulte ce qui suggère la présence d'un processus de maturation (Fig. 4.1). Ce processus de maturation coïncide avec la réexpression des

cyclines D1 et D2 dans les cellules différenciées (Fig. 4.1). En plus de leur rôle dans le cycle cellulaire, les cyclines D permettent la croissance cellulaire, c'est-à-dire l'augmentation de la masse cellulaire chez la drosophile. Les cellules postmitotiques soumises à une surexpression de cycline D1/cdk4 subissent un élargissement ³³⁸. Dans les cellules corticotropes postmitotiques hypophysaires, c'est vraisemblablement lorsque cette maturation est terminée que la cellule est apte à répondre aux différents signaux provenant de son environnement.

2. LA RÉPONSE HORMONALE DES CELLULES CORTICOTROPES

Le contrôle de l'expression de POMC est probablement le point clé de la biologie des cellules corticotropes. Plusieurs signaux peuvent influencer son expression, mais les principaux demeurent le CRH et les Gc.

2.1. CRH ET GLUCOCORTICOÏDES

Au niveau du promoteur de POMC, plusieurs facteurs de transcription et cofacteurs agissent de concert pour activer et réprimer le promoteur (voir Chapitre 1, section 2). Les dernières années ont révélé que NGFI-B, Tpit, SRC2 et Rb sont des médiateurs de la réponse au CRH ^{76,77,89,91} et j'ai démontré que Brg1 et HDAC2 forment le cœur de la réponse aux Gc (voir Chapitre 2), Toutefois, nous ne connaissons pas les mécanismes moléculaires précis de ces régulations.

2.1.1. LES MÉCANISMES DE LA TRANS-RÉPRESSION DE POMC

L'association de Brg1, GR, NGFI-B et HDAC2 sous-entend l'existence d'un complexe trans-répresseur au niveau du promoteur de POMC, complexe dont la fonction première est de réprimer la transcription. Plusieurs mécanismes de répression sont envisageables : 1) un blocage de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur, 2) une modification dans la structure chromatinienne du locus le rendant réfractaire à la transcription et 3) le déplacement de coactivateurs essentiels.

Les deux premières hypothèses sont hautement plausibles puisque nos résultats indiquent un blocage de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur en présence de Gc en plus de changement dans le niveau d'acétylation de l'histone H4 (Fig. 2.7). Ce changement d'acétylation pourrait refermer la structure chromatinienne et bloquer le déplacement de l'ARN polymérase II. La réalisation d'une cinétique très précise des niveaux d'acétylation suite à l'action des Gc permettra de les comparer avec le recrutement de l'ARN polymérase II. Si l'environnement chromatinien induit le blocage de l'ARN polymérase II, un décalage entre les deux courbes sera observable c'est-à-dire que la

déacétylation sera le premier événement à se produire. Si l'ARN polymérase II est coincée au niveau du promoteur, nous devrions observer une diminution de son recrutement sur les exons suite à un traitement prolongé aux Gc.

Le positionnement précis des nucléosomes au niveau du locus, et plus spécifiquement au niveau du promoteur de POMC, n'est pas connu. La technique des CHIP-on-chip permettra de positionner ces nucléosomes sur le locus de POMC et de voir s'ils se déplacent en fonction des stimulations hormonales. Le promoteur de POMC profite certainement d'un environnement chromatinien favorable à la transcription. La stimulation par les Gc pourrait entraîner le glissement d'un nucléosome dans la région promotrice, la rendant inapte à la transcription.

Les Gc répriment l'activité transcriptionnelle induite par le CRH d'où la troisième hypothèse du déplacement de coactivateurs. Cependant, nous ne connaissons pas la cinétique de recrutement des différents facteurs au niveau du promoteur de POMC suite à une stimulation par le CRH. Pour l'instant, la majorité des études ont été réalisées à un point fixe de 30 minutes après la stimulation. Pour plusieurs promoteurs, l'activation dépend de vagues successives de recrutement et de dégradation des différents cofacteurs ^{356,357}. Des phénomènes similaires pourraient avoir lieu au niveau du promoteur de POMC. Établir cette cinétique pour chacun des facteurs impliqués dans la réponse hormonale est un pré-requis en vue de comprendre le fonctionnement et les mécanismes de la réponse au CRH et aux Gc. Il sera intéressant de comparer l'évolution de cette cinétique en présence de Gc et d'étudier l'effet sur le recrutement de ces coactivateurs. Par exemple, nous avons montré que SRC2 est un coactivateur important pour la réponse au CRH ⁷⁷. Il s'avère que dans le contexte de la trans-répression entre AP1 et GR, SRC2 joue aussi le rôle de corépresseur ^{115,116}. Si tel est le cas pour le promoteur de POMC, ce facteur, à l'instar de Brg1, devrait être présent aussi bien lors de l'activation que de la répression.

2.1.2. LA FONCTION DE BRG1 ET HDAC2 DANS LE COMPLEXE TRANS-RÉPRESSEUR

Tel que démontré dans le Chapitre 2, Brg1 est au cœur de la répression par les Gc. Les résultats de ChIP et d'ARNi ont montré un recrutement de Brg1 aussi bien en situation d'activation que de répression (Fig. 2.2 et 2.3) et que la perte de son expression entraîne une diminution de l'expression de POMC, activité qui n'est plus sensible aux Gc. Mes résultats indiquent que la perte d'expression de Brg1 n'affecte pas seulement la réponse aux Gc, mais aussi celle au CRH. En fait, la réponse au CRH est complètement abolie en présence d'un ARNi contre Brg1 (résultats non montrés). La présence constitutive de Brg1 au niveau du promoteur, en plus de sa fonction dans la réponse au CRH et aux Gc, argumentent en faveur d'un rôle comme plate-forme d'échange pour les différents cofacteurs impliqués dans la réponse hormonale. Des études comparatives plus poussées seront nécessaires pour comprendre l'organisation des complexes protéiques dans les diverses conditions de stimulation au niveau du promoteur de POMC.

Les HDACs sont essentiels à la répression par les Gc. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de HDACs bloque complètement la répression du promoteur POMC par les Gc. Le résultat le plus frappant, pour l'instant inexplicé, est que les inhibiteurs des HDACs transforment GR de répresseur en activateur du promoteur POMC (Fig. 2.6). L'hypothèse la plus plausible est que la présence des HDACs actifs au niveau du promoteur masque l'effet des coactivateurs. Donc, nous devrions être en mesure de déterminer en ChIP quels sont les coactivateurs qui demeurent au promoteur même lorsque le complexe GR/HDAC2 est recruté. Ces facteurs, dont le recrutement ne sera pas affecté par l'arrivée de GR (tel que Brg1), seront des candidats de choix pour un double rôle dans l'activation et la répression. Je pense que les approches protéomiques de purifications de complexes protéiques à partir des divers facteurs impliqués dans la réponse hormonale apportera plusieurs réponses sur les différentes interactions en plus de fournir de nouvelles protéines candidates.

2.2. UN MODÈLE GÉNÉRAL DE TRANS-RÉPRESSION

La trans-répression par GR n'est pas unique au promoteur de la POMC (voir Chapitre 1, section 2.3.3). En effet, plusieurs gènes cibles de NF κ B et AP1 sont efficacement réprimés par ce mécanisme d'action. La probabilité de trouver un mécanisme général de trans-répression est assez mince étant donné la variété de promoteurs et de facteurs les régulant. La trans-répression entre GR et NF κ B n'est pas dépendante de Brg1 contrairement à celle de AP1 (résultats non montrés effectué dans les cellules A427, Brm/Brg1 -/-). Cependant, je n'ai pas pu reconstituer la trans-répression entre GR et AP1 en complémentant avec Brg1 suggérant que d'autres facteurs essentiels sont absents de ces cellules. En ce qui concerne la trans-répression entre GR et NF κ B, certaines composantes sont conservées. Les gènes activés par NF κ B recrutent HDAC2 et Brg1 en situation de répression par GR³⁵⁸. Les Gc contrôlent en grande partie la réponse anti-inflammatoire et la compréhension de ces mécanismes est d'une importance capitale. Toutefois, l'extrapolation de nos résultats vers un modèle général de trans-répression semble illusoire.

2.3. LA RÉSISTANCE HORMONALE

Présentement, il n'existe aucun modèle viable de souris résistante aux Gc. La démonstration ultime que Brg1 et/ou Brm ainsi que HDAC2 sont les régulateurs majeurs de la réponse aux Gc du promoteur de POMC sera de faire l'invalidation de ces gènes dans les cellules corticotropes *in vivo*. Un projet en cours dans notre laboratoire est de procéder à la double invalidation de Brg1 et Brm dans les cellules corticotropes à l'aide d'une souris transgénique exprimant la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur de POMC (POMC-Cre). Nous pensons que ces souris développeront des symptômes similaires à ceux d'un syndrome de Cushing puisque GR ne pourra plus réprimer l'expression de POMC. L'augmentation des Gc circulant causera de multiples problèmes au niveau du fonctionnement de plusieurs systèmes (Table I).

L'invalidation de HDAC2 chez la souris provoque une résistance à l'hypertrophie cardiaque, mais la fonction hypophysaire n'a pas été investigué³⁴¹. Plusieurs

inhibiteurs de HDACs sont présentement en phase clinique d'essais pour le traitement de divers cancers. La démonstration que ces inhibiteurs, tel que le valproate, renversent la réponse hormonale de l'axe HPA, remet en cause leur utilisation. Des expériences en souris devront être conduites pour déterminer si la prise prolongée d'inhibiteurs de HDACs affecte la physiologie de l'axe HPA en vérifiant la réponse aux Gc. Le traitement des patients de façon chronique avec de tels inhibiteurs pourraient entraîner une augmentation de l'ACTH et des Gc dans la circulation sanguine ce qui causerait le syndrome de Cushing. De plus, certaines tumeurs pulmonaires expriment de façon ectopique la POMC³⁵⁹. La perte de HDAC2 pourrait expliquer pourquoi POMC est activée dans ces cellules. Il serait intéressant d'utiliser ces modèles cellulaires pour tester si les Gc activent l'expression de POMC.

La régulation hormonale du promoteur de POMC est extrêmement complexe et je crois que l'identification des facteurs essentiels n'est que la première étape d'un long processus qui vise à comprendre les mécanismes moléculaires de ces réponses.

3. LA TUMORIGÉNÈSE HYPOPHYSAIRE

Les tumeurs hypophysaires atteignent une personne sur cinq sans toutefois que nous en connaissions les mécanismes moléculaires précis. La majorité de ces tumeurs sont bénignes, mais certaines sont extrêmement dommageables pour l'organisme compte tenu des hormones qu'elles expriment, telles que les adénomes corticotropes causant le syndrome de Cushing.

3.1. LA MALADIE DE CUSHING (ADÉNOMES CORTICOTROPES)

Il n'existe présentement aucun modèle de souris présentant des tumeurs corticotropes. L'établissement d'un modèle murin de la maladie de Cushing représente donc un défi important. En revanche, contrairement aux cellules corticotropes, les cellules mélanotropes du LI de l'hypophyse sont extrêmement sensibles à la tumorigénèse et par conséquent les modèles de souris abondent. Ces modèles, combinés avec des observations faites dans les tumeurs humaines, permettent d'établir des hypothèses sur l'origine de ces tumeurs.

3.1.1. LES VOIES POTENTIELLES À L'ORIGINE DE LA TUMORIGÉNÈSE

Une série d'observations publiées dans la littérature ainsi que nos résultats permettent de dégager deux voies possibles menant à la tumorigénèse hypophysaire : 1) la voie de cycline E/p27^{Kip1} et 2) la voie de cycline D/cdk4/p18^{INK4c}/pRb.

La voie cycline E/p27^{Kip1}. Dans les tumeurs corticotropes des patient atteints de la maladie de Cushing, les cellules corticotropes peuvent proliférer et causer un adénome (Fig. 1.7 et 4.2). Nous avons corrélé l'expression de cycline E avec les adénomes corticotropes (Fig. 4.3). La fonction de cycline E serait de permettre la réentrée des cellules postmitotiques dans le cycle cellulaire. En effet, les fibroblastes quiescents provenant des souris cycline E1/E2-/- sont incapables de réintégrer le cycle cellulaire ²¹¹. L'expression de cycline E est requise pour permettre l'assemblage des complexes nécessaires à la réplication ²¹⁴.

L'expression normale de p27^{Kip1} est requise pour le maintien de l'homéostasie de la glande pituitaire. Son expression exclusive dans les cellules différenciées

laisse entrevoir un rôle au niveau de ces cellules. Ce membre de la famille Cip/Kip est un inhibiteur des fonctions du complexe cycline E/cdk2²⁰⁴. La perte de p27^{Kip1} est souvent associée à une surexpression de cycline E chez les patients atteints de la maladie de Cushing (Fig. 4.3) et nous croyons que ces deux événements conduisent à l'entrée des cellules corticotropes dans le cycle cellulaire.

Ce mécanisme de tumorigénèse impliquant l'expression de cycline E ainsi que la perte d'expression de p27^{Kip1} pourrait ne pas être restreint aux cellules POMC. En effet, le niveau d'expression de p27^{Kip1} le plus élevé est détecté dans les cellules gonadotropes (résultats non montrés). Nous ne savons pas si ce type cellulaire est affecté dans les hypophyses p27^{Kip1}^{-/-}. En effet, les adénomes mélanotropes présents chez ces souris pourraient masquer d'éventuels microadénomes gonadotropes²³⁸⁻²⁴⁰. Une simple immunofluorescence avec LH et FSH permettra d'identifier la présence ou non d'adénomes gonadotropes chez ces souris p27^{Kip1}^{-/-}. L'expression de cycline E corrèle avec les adénomes corticotropes de la maladie de Cushing, mais nous ne savons pas ce qu'il en est des adénomes gonadotropes²⁰⁷. Je pense que cette voie vers la tumorigénèse pourrait être partagée par plusieurs types de tumeurs différenciées.

Beaucoup d'efforts sont présentement mis sur l'identification de cellules souches tumorales dans divers types de cancers. Cette théorie est basée sur l'observation que dans certaines tumeurs un petit nombre de cellules non-différenciées prolifératives constitue le cœur de la tumeur et sont responsables de sa croissance. Nos évidences suggèrent qu'il existe une alternative à ce modèle dans la maladie de Cushing puisque ce sont des cellules différenciées qui prolifèrent ; modèle qui pourrait bien être partagé par plusieurs des autres types de tumeurs différenciées, hypophysaires ou non.

La voie Cycline D/cdk4/p18^{INK4c}/pRb. L'hypothèse d'une cellule précurseur tumorale n'est pas exclue pour expliquer la tumorigénèse hypophysaire. La perte de p18^{INK4c} a été associée à la maladie de Cushing en plus de l'expression de cycline E^{207,268}. L'inactivation de p18^{INK4c} chez la souris mène au développement

rapide d'adénomes du lobe intermédiaire avec une pénétrance de 100%^{232,266}. Cet inhibiteur du cycle cellulaire bloque la fonction du complexe cycline D/cdk4 qui à son tour régule l'activité de pRb. En effet, la phosphorylation de pRb par le complexe cycline D/cdk4 permet de lever la répression des gènes nécessaires pour la phase S³⁶⁰. Tout comme pour les mutants p18^{INK4c}, les souris pRb^{+/-} développent des tumeurs du lobe intermédiaire dans 100% des cas en plus d'une multitude d'autres tumeurs⁹⁰. À la différence des tumeurs hypophysaires induites par la perte de p27^{Kip1}, les tumeurs hypophysaires des souris p18^{INK4c}^{-/-} et pRb^{+/-} progressent très rapidement. p27^{Kip1} et p18^{INK4c}/pRb ne sont pas dans la même voie génétique puisque la double invalidation de ces gènes accélèrent la tumorigénèse hypophysaire^{266,278}. Cependant, la perte de cdk4 freine la progression des tumeurs induites dans les hypophyses p18^{INK4c}^{-/-} confirmant leur interrelation²⁶⁷.

Nous ne connaissons pas le patron d'expression exact de ces régulateurs du cycle cellulaire dans l'hypophyse. L'apparition très précoce des tumeurs hypophysaires ainsi que la grande variété des types cellulaires présents dans les tumeurs des souris p18^{INK4c}^{-/-} et pRb^{+/-} suggèrent que ces régulateurs du cycle cellulaire interviennent au niveau des progéniteurs prolifératifs. La perte de ces gènes entraînerait un déséquilibre de la transition G1-S des cellules en prolifération. Ainsi, les cellules continueraient de proliférer ce qui entraînerait le développement d'un adénome. Un des gènes cibles du complexe cycline D/cdk4/pRb pourrait être p57^{Kip2}. En absence de p57^{Kip2}, nous avons noté une augmentation de la prolifération des progéniteurs non-différenciés, et une augmentation globale des cellules différenciées (Fig. 2.4) pourrait caractériser les hypophyses p18^{INK4c}^{-/-} et pRb^{+/-}.

Dépendamment du type de progéniteur affecté (en supposant un certain degré de spécification), l'adénome exprimera une ou plusieurs hormones. Selon cette hypothèse, nous aurions un exemple de cellule « souche » tumorale à l'origine de la formation de l'adénome. La démonstration de l'existence d'une telle cellule serait extrêmement simple car il suffirait d'effectuer un comarquage entre les hormones hypophysaires et un marqueur de prolifération. Ainsi, nous pourrions

démontrer que les cellules prolifératives des hypophyses issues souris $p18^{INK4c-/-}$ et $pRb+/-$ sont non-différenciées. L'expérience la plus tranchée serait de croiser les souris POMC-Cre avec des souris Flox-pRb et Flox- $p18^{INK4c}$. Si l'hypothèse d'une cellule souche tumorale est fondée, ces souris ne devraient pas développer d'adénomes corticotropes et/ou mélanotropes puisque le transgène ne s'exprime que dans les cellules différenciées POMC-positives.

En résumé, il existe plusieurs façons de créer une tumeur. Transformer une cellule différenciée ou affecter la prolifération d'un précurseur représentent deux des mécanismes possibles. Au niveau hypophysaire, l'existence de ces deux mécanismes permettrait d'expliquer plusieurs des observations qui ont été faites dans les divers modèles animaux ainsi que chez l'homme.

3.1.2. BRG1 ET HDAC2, DES SUPPRESEURS DE TUMEURS ?

L'association entre l'expression aberrante de Brg1, un potentiel suppresseur de tumeurs ²⁹⁵, et la maladie de Cushing suggère que son invalidation dans les cellules POMC pourrait causer l'apparition d'adénomes corticotropes et mélanotrope chez la souris. La perte de son expression entraîne l'augmentation du niveau de la protéine cycline E (Fig. 4.5) qui permet la réentrée des cellules dans le cycle cellulaire ²¹¹. De plus, Brg1 pourrait induire l'expression de $p27^{Kip1}$. La perte de Brg1 produirait une résistance aux Gc en plus de la tumorigénèse des cellules corticotropes. L'utilisation du transgène POMC-Cre permettra de déléter Brg1 exclusivement dans les cellules POMC et par conséquent si les souris développent des tumeurs hypophysaires ce sera fort probablement ces cellules POMC qui proliféreront. Ce sera une démonstration directe qu'il est possible de manipuler une cellule différenciée pour lui permettre de revenir dans le cycle cellulaire.

Nous ne connaissons pas les cibles directes du complexe Brg1/HDAC2. L'utilisation de CHIP-on-chip permettrait d'identifier ces différentes cibles liées en particulier au contrôle du cycle cellulaire. Parmi celles-ci, nous nous attendons à retrouver les régulateurs de la tumorigénèse hypophysaire tels que cycline E, $p27^{Kip1}$, $p18^{INK4c}$ et pRb. Toutefois, il existe certainement d'autres voies vers la

tumorigénèse que nous ignorons toujours. L'identification des cibles de HDAC2 est d'une importance capitale puisque les inhibiteurs des HDACs sont actuellement utilisés en essais cliniques dans les traitements contre le cancer. S'il s'avère juste que certains HDACs puissent agir comme des suppresseurs de tumeurs, alors l'utilisation de ces inhibiteurs dans le traitement du cancer risque de causer autant de problèmes que de solutions.

La présence d'un adénome corticotrope et la résistance aux Gc sont les deux caractéristiques principales de la maladie de Cushing. Je crois que les résultats que nous avons obtenus permettent d'émettre l'hypothèse que ces deux événements sont concomitants et peuvent dépendre d'une seule protéine, en l'occurrence Brg1 ou HDAC2.

3.2. LES AUTRES TYPES DE TUMEURS HYPOPHYSAIRES

Les cellules souches tumorales et la dédifférenciation sont les deux théories avancées pour expliquer l'origine des tumeurs. Étant donné la diversité et le nombre de tumeurs d'origine hypophysaire, cet organe représente un excellent outil pour confronter ces deux théories

3.2.1. LES TUMEURS NON-DIFFÉRENCIÉES

Les résultats obtenus suite à l'étude des souris $p57^{Kip2-/-}$ suggèrent qu'il est possible d'affecter la prolifération des progéniteurs sans affecter la différenciation. Les conséquences à long terme de cette délétion ne sont pas connues (car elle est létale), mais nous pouvons supposer que ces souris développeraient des adénomes non-différenciés. Chez l'homme, les adénomes non-fonctionnels sont souvent des macroadénomes ayant une croissance plus rapide que celle des tumeurs différenciées³³⁹. La perte de $p57^{Kip2}$ pourrait être l'une des causes de ces tumeurs. En accord avec cette hypothèse, nous retrouvons des mutations de $p57^{Kip2}$ dans près de 50% des cas familiaux du syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), caractérisé par une organomégalie et une susceptibilité élevée au développement spontané de tumeurs^{252,331}.

Cependant, aucun désordre endocrinien provenant de l'hypophyse n'a été rapporté à ce jour chez ces patients.

Si la perte de $p57^{Kip2}$ augmente la sensibilité à la tumorigénèse, son expression pourrait à l'inverse protéger la cellule. Au cours du Chapitre 3, j'ai démontré qu'en absence de $Tpit$, les cellules du LI de l'hypophyse sont bloquées à un stade $p57^{Kip2+}$, $p27^{Kip1+}$. Les hypophyses des souris $p27^{Kip1-/-}$ développent des tumeurs du LI avec une pénétrance de 100%,²³⁸⁻²⁴⁰. L'invalidation de $Tpit$ dans le fond génétique $p27^{Kip1-/-}$ générerait des souris exprimant $p57^{Kip2}$ à la place de $p27^{Kip1}$. La comparaison du phénotype hypophysaire de ces souris permettrait de vérifier la potentielle redondance fonctionnelle entre ces deux inhibiteurs du cycle cellulaire. Si tel est le cas, nous devrions assister à un ralentissement de la progression des adénomes mélanotropes présents dans les souris $p27^{Kip1-/-}$ en absence de $Tpit$.

3.2.2. LES TUMEURS PLURIHORMONALES

Une forme de tumeur hypophysaire fascinante est celle qui produit plusieurs hormones. Nous pouvons imaginer que plusieurs événements dans des cellules différenciées distinctes sont à l'origine de ces tumeurs, mais cette probabilité est extrêmement faible. De plus, dans les tumeurs plurihormonales les différents types cellulaires sont mélangés ce qui exclue l'hypothèse de l'association de multiples foyers tumoraux³³⁹. Une alternative attrayante est que ces tumeurs proviendraient d'une cellule progéniteur et qu'il existe un lien intime entre le nombre d'hormones exprimées et le degré de spécification de ce progéniteur. Par exemple, une tumeur exprimant à la fois POMC et LH proviendrait d'un précurseur commun à ces deux lignées. À l'extrême, une « méga-tumeur » exprimant toutes les hormones serait causée par une véritable cellule souche hypophysaire devenue tumorale et capable de donner naissance à tous les types cellulaires hypophysaires. Une étude approfondie des divers modèles de souris développant des tumeurs hypophysaires devra être faite, en accordant une attention particulière aux différentes hormones exprimées en collaboration avec la caractérisation des cellules prolifératives.

4. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA VIE D'UNE CELLULE CORTICOTROPE : UN SCHÉMA RÉCAPITULATIF

Le cheminement d'une cellule corticotrope est un processus long contenant plusieurs points de contrôle. Nous pouvons définir trois étapes clés du développement normal : 1) La sortie du cycle cellulaire, 2) la différenciation et 3) la maturation des cellules corticotropes (Fig. 5.1). Le passage entre ces différentes phases est assuré respectivement par des facteurs définis tels que $p57^{Kip2}$, Tpit et potentiellement les cyclines Ds.

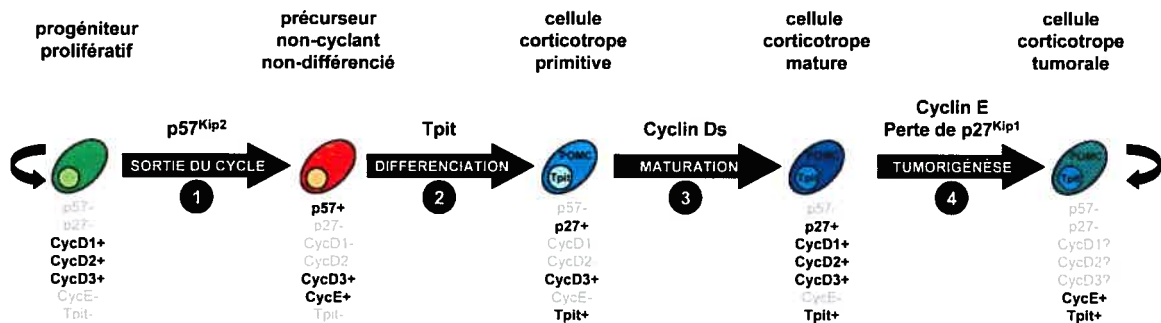


Figure 5.1. Les étapes-clés de la biologie corticotrope

Je crois qu'il existe deux points de contrôle principaux pour la tumorigénèse corticotrope et mélanotrope : A) le contrôle de la prolifération du progéniteur par le complexe cycline D/cdk4/p18^{INK4c} et B) la réintégration du cycle cellulaire de la cellule POMC par l'expression de cycline E et la perte de $p27^{Kip1}$. Cette séquence linéaire permet de faire le lien entre le développement normal et la tumorigénèse dans l'hypophyse.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail que j'ai accompli sur l'hypophyse m'a permis d'établir des concepts généraux potentiellement applicables à d'autres organes. Le concept du découplage de la prolifération et de la différenciation lors du développement normal est directement applicable aux protocoles visant la manipulation des cellules souches. Plusieurs laboratoires s'intéressent à la production de cellules différenciées, par exemple de neurones dopaminergiques ³⁶¹. La stratégie employée consiste le plus souvent à surexprimer les facteurs de transcription ayant un rôle dans la différenciation en espérant obtenir des cellules matures et fonctionnelles. Puisque ce ne sont pas les signaux de différenciation qui induisent la sortie du cycle cellulaire, la bonne stratégie serait probablement de forcer cette sortie du cycle cellulaire avant d'induire la différenciation terminale.

Les étroites relations entre le développement normal et la tumorigénèse se reflètent au niveau du contrôle de la prolifération. La susceptibilité de l'hypophyse à la tumorigénèse ainsi que la connaissance des étapes clés de son développement précoce rendent cet organe particulièrement attrayant pour étudier les mécanismes du contrôle du cycle cellulaire dans les contextes développemental et tumorigénique. Une analyse approfondie des différents modèles de souris permettra certainement de confirmer cette relation privilégiée entre les processus développementaux et les mécanismes menant à l'induction de la tumorigénèse.

RÉFÉRENCES

1. Hadley, M.E. *Endocrinology*, 5th edition. 2000. New Jersey, USA, Prentice Hall, NJ.
2. Soloff, M.S., Alexandrova, M. & Fernstrom, M.J. Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation? *Science* **204**, 1313-1315 (1979).
3. Nishimori, K. *et al.* Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 11699-11704 (1996).
4. Dubois, P.M., el Amraoui, A. & Heritier, A.G. Development and differentiation of pituitary cells. *Microsc. Res. Tech.* **39**, 98-113 (1997).
5. Hadley, M.E. & Haskell-Luevano, C. The proopiomelanocortin system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**, 1-21 (1999).
6. Chen, C.L.C., Dionne, F.T. & Roberts, J.L. Regulation of the pro-opiomelanocortin mRNA levels in rat pituitary by dopaminergic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2211-2215 (1983).
7. Loeffler, J.-P., Demeneix, B.A., Kely, N.A. & Höllt, V. Dopamine inhibition of proopiomelanocortin gene expression in the intermediate lobe of the pituitary. *Neuroendocrinol.* **47**, 95-101 (1988).
8. Collu, R. *et al.* A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 1561-1565 (1997).
9. Hayashizaki, Y., Hiraoka, Y., Endo, Y., Miyai, K. & Matsubara, K. Thyroid-stimulating hormone (TSH) deficiency caused by a single base substitution in the CAGYC region of the beta-subunit. *EMBO J.* **8**, 2291-2296 (1989).
10. Medeiros-Neto, G. *et al.* A circulating, biologically inactive thyrotropin caused by a mutation in the beta subunit gene. *J. Clin. Invest* **97**, 1250-1256 (1996).
11. Maya-Nunez, G. *et al.* Molecular basis of hypogonadotropic hypogonadism: restoration of mutant (E(90)K) GnRH receptor function by a deletion at a distant site. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**, 2144-2149 (2002).
12. Meysing, A.U. *et al.* GNRHR Mutations in a Woman with Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Highlight the Differential Sensitivity of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone to Gonadotropin-Releasing Hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **89**, 3189-3198 (2004).
13. Silveira, L.F. *et al.* Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR "knockout". *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**, 2973-2977 (2002).
14. Pralong, F.P. *et al.* Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **84**, 3811-3816 (1999).

15. Marcinkiewicz, M., Day, R., Seidah, N.G. & Chretien, M. 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 (1993).
16. McKay, L.I. & Cidlowski, J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* **20**, 435-459 (1999).
17. Oldfeld, E.H. Cushing disease. *J. Neurosurg.* **98**, 948-951 (2003).
18. Mishina, M. *et al.* DNA sequences required for transcription in vivo of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene. *EMBO J* **1**, 1533-1538 (1982).
19. Tremblay, Y. *et al.* Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8890-8894 (1988).
20. Jeannotte, L., Trifiro, M.A., Plante, R.K., Chamberland, M. & Drouin, J. Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4058-4064 (1987).
21. Therrien, M. & Drouin, J. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2342-2353 (1993).
22. Therrien, M. & Drouin, J. Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3492-3503 (1991).
23. Hammer, G.D., Fairchild-Huntress, V. & Low, M.J. Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1689-1697 (1990).
24. Young, J.I. *et al.* 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 (1998).
25. de Souza, F.S. *et al.* Identification of neuronal enhancers of the proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting. *Mol. Cell Biol* **25**, 3076-3086 (2005).
26. Liu, B., Hammer, G.D., Rubinstein, M., Mortrud, M. & Low, M.J. Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary gland of transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3978-3990 (1992).
27. Liu, B., Mortrud, M. & Low, M.J. DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *Biochem. J.* **312** (Pt 3), 827-832 (1995).
28. Riegel, A.T., Remenick, J., Wolford, R.G., Berard, D.S. & Hager, G.L. A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the pro-opiomelanocortin gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4513-4521 (1990).
29. Gerrero, M.R. *et al.* Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10841-10845 (1993).

30. Lamonerie, T. *et al.* PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* **10**, 1284-1295 (1996).
31. Poulin, G., Turgeon, B. & Drouin, J. NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6673-6682 (1997).
32. Naya, F.J., Stellrecht, C.M.M. & Tsai, M.J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* **9**, 1009-1019 (1995).
33. Poulin, G., Lebel, M., Chamberland, M., Paradis, F.W. & Drouin, J. Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4826-4837 (2000).
34. Kispert, A. & Hermann, B.G. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* **12**, 4898-4899 (1993).
35. Lamolet, B. *et al.* A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* **104**, 849-859 (2001).
36. Lamolet, B. *et al.* Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol. Endocrinol.* **18**, 995-1003 (2004).
37. Akita, S. *et al.* Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J. Clin. Invest.* **95**, 1288-1298 (1995).
38. Ray, D.W., Ren, S.G. & Melmed, S. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J. Clin. Invest.* **97**, 1852-1859 (1996).
39. Akita, S., Malkin, J. & Melmed, S. Disrupted murine leukemia inhibitory factor (LIF) gene attenuates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion. *Endocrinology* **137**, 3140-3143 (1996).
40. Ware, C.B., Kariagina, A., Zonis, S., Alon, D. & Chesnokova, V. Leukemia inhibitory factor signaling is implicated in embryonic development of the HPA axis. *FEBS Lett.* **579**, 4465-4469 (2005).
41. Bousquet, C., Zatelli, M.C. & Melmed, S. Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J. Clin. Invest.* **106**, 1417-1425 (2000).
42. Mynard, V., Guignat, L., Devin-Leclerc, J., Bertagna, X. & Catelli, M.G. Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology* **143**, 3916-3924 (2002).
43. Hillhouse, E.W. & Grammatopoulos, D.K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev.* **27**, 260-286 (2006).
44. Labrie, F. *et al.* Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. *Science* **216**, 1007-1008 (1982).
45. Reisine, T., Rougon, G., Barbet, J. & Affoter, H.U. Corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotropin-hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the

- inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary tumor cells by liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8261-8265 (1985).
46. Kuryshev, Y.A., Childs, G.V. & Ritchie, A.K. Corticotropin-releasing hormone stimulates Ca²⁺ entry through L- and P-type Ca²⁺ channels in rat corticotropes. *Endocrinology* **137**, 2269-2277 (1996).
 47. Kuryshev, Y.A., Childs, G.V. & Ritchie, A.K. Corticotropin-releasing hormone stimulation of Ca²⁺ entry in corticotropes is partially dependent on protein kinase A. *Endocrinology* **136**, 3925-3935 (1995).
 48. Kovalovsky, D. *et al.* Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1638-1651 (2002).
 49. Zhang, Z. *et al.* Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res.* **14**, 580-590 (2004).
 50. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163 (1999).
 51. McKenna, N.J. & O'Malley, B.W. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* **143**, 2461-2465 (2002).
 52. Cheng, L.E.C., Chan, F.K.M., Cado, D. & Winoto, A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* **16**, 1865-1875 (1997).
 53. Paulsen, R.E., Granas, K., Johnsen, H., Rolseth, V. & Sterri, S. Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J. Mol. Neurosci.* **6**, 249-255 (1995).
 54. Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M. & Milbrandt, J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296-1300 (1991).
 55. Forman, B.M., Umesono, K., Chen, J. & Evans, R.M. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**, 541-550 (1995).
 56. Perlmann, T. & Jansson, L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**, 769-782 (1995).
 57. Maira, M.H., Martens, C., Philips, A. & Drouin, J. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7549-7557 (1999).
 58. Davis, I.J., Hazel, T.G., Chen, R.H., Blenis, J. & Lau, L.F. Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol. Endocrinol.* **7**, 953-964 (1993).
 59. Hirata, Y., Kiuchi, K., Chen, H.C., Milbrandt, J. & Guroff, G. The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J. Biol. Chem.* **268**, 24808-24812 (1993).

60. Katagiri, Y., Hirata, Y., Milbrandt, J. & Guroff, G. Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* **272**, 31278-31284 (1997).
61. Hirata, Y. *et al.* Induction of a nerve growth factor-sensitive kinase that phosphorylates the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J. Neurochem.* **65**, 1780-1788 (1995).
62. Swanson, K.D. *et al.* Transcription factor phosphorylation by pp90(rsk2). Identification of Fos kinase and NGFI-B kinase I as pp90(rsk2). *J. Biol. Chem.* **274**, 3385-3395 (1999).
63. Masuyama, N. *et al.* Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 32799-32805 (2001).
64. Pekarsky, Y. *et al.* Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3690-3694 (2001).
65. Katagiri, Y. *et al.* Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat. Cell Biol.* **2**, 435-440 (2000).
66. Lee, S.L. *et al.* Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (NUR77). *Science* **269**, 532-535 (1995).
67. Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L. & Perlmann, T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1656-1666 (1996).
68. Ponnio, T., Burton, Q., Pereira, F.A., Wu, D.K. & Conneely, O.M. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Mol. Cell Biol.* **22**, 935-945 (2002).
69. Ponnio, T. & Conneely, O.M. nor-1 regulates hippocampal axon guidance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Mol. Cell Biol.* **24**, 9070-9078 (2004).
70. DeYoung, R.A., Baker, J.C., Cado, D. & Winoto, A. The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *J Biol. Chem.* **278**, 47104-47109 (2003).
71. Zetterstrom, R.H. *et al.* Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250 (1997).
72. Wilson, T.E., Mouw, A.R., Weaver, C.A., Milbrandt, J. & Parker, K.L. The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 861-868 (1993).
73. Zhang, P. & Mellon, S.H. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. *Mol. Endocrinol.* **11**, 891-904 (1997).
74. Fernandez, P.M. *et al.* Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **141**, 2392-2400 (2000).
75. Davis, I.J. & Lau, L.F. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3469-3483 (1994).

76. Philips,A. *et al.* Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5946-5951 (1997).
77. Maira,M.H., Martens,C., Batsche,E., Gauthier,Y. & Drouin,J. 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 (2003).
78. McKenna,N.J., Lanz,R.B. & O'Malley,B.W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* **20**, 321-344 (1999).
79. McKenna,N.J. & O'Malley,B.W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465-474 (2002).
80. Xu,J. & Li,Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1681-1692 (2003).
81. Xu,J. & O'Malley,B.W. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev. Endocr. Metab Disord.* **3**, 185-192 (2002).
82. Lipinski,M.M. & Jacks,T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* **18**, 7873-7882 (1999).
83. Brehm,A. *et al.* Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**, 597-601 (1998).
84. Magnaghi-Jaulin,L. *et al.* Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-605 (1998).
85. Zhang,H.S. *et al.* Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79-89 (2000).
86. Singh,P., Coe,J. & Hong,W. A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature* **374**, 562-565 (1995).
87. Singh,P., Chan,S.W. & Hong,W. Retinoblastoma protein is functionally distinct from its homologues in affecting glucocorticoid receptor-mediated transcription and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 13762-13770 (2001).
88. Batsche,E., Moschopoulos,P., Desroches,J., Bilodeau,S. & Drouin,J. Retinoblastoma and the related pocket protein p107 act as coactivators of NeuroD1 to enhance gene transcription. *J Biol Chem* **280**, 16088-16095 (2005).
89. Batsche,E., Desroches,J., Bilodeau,S., Gauthier,Y. & Drouin,J. Rb enhances p160/SRC coactivator-dependent activity of nuclear receptors and hormone responsiveness. *J Biol Chem* **280**, 19746-19756 (2005).
90. Jacks,T. *et al.* Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**, 295-300 (1992).
91. Maira,M.H. *et al.* The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 coactivators and mediates hormone action. *J. Biol. Chem.* **278**, 46523-46532 (2003).
92. Boutillier,A.L. *et al.* Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol. Endocrinol.* **9**, 745-755 (1995).

93. Gagner, J.-P. & Drouin, J. Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol. Cell. Endocrinol.* **40**, 25-32 (1985).
94. Stevens, A. *et al.* Dissociation of steroid receptor coactivator 1 and nuclear receptor corepressor recruitment to the human glucocorticoid receptor by modification of the ligand-receptor interface: the role of tyrosine 735. *Mol. Endocrinol.* **17**, 845-859 (2003).
95. James, P., Pfund, C. & Craig, E.A. Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* **275**, 387-389 (1997).
96. Lu, N.Z. & Cidlowski, J.A. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol.* **16**, 301-307 (2006).
97. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* **24**, 488-522 (2003).
98. Kucera, T., Waltner-Law, M., Scott, D.K., Prasad, R. & Granner, D.K. A point mutation of the AF2 transactivation domain of the glucocorticoid receptor disrupts its interaction with steroid receptor coactivator 1. *J Biol. Chem.* **277**, 26098-26102 (2002).
99. Subramaniam, N., Treuter, E. & Okret, S. Receptor interacting protein RIP140 inhibits both positive and negative gene regulation by glucocorticoids. *J Biol. Chem.* **274**, 18121-18127 (1999).
100. Tazawa, H. *et al.* Regulation of subnuclear localization is associated with a mechanism for nuclear receptor corepression by RIP140. *Mol. Cell Biol.* **23**, 4187-4198 (2003).
101. Fryer, C.J. & Archer, T.K. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* **393**, 88-91 (1998).
102. Bradshaw, M.S., Tsai, M.J. & O'Malley, B.W. A steroid response element can function in the absence of a distal promoter. *Mol. Endocrinol.* **2**, 1286-1293 (1988).
103. Scott, D.K., Stromstedt, P.E., Wang, J.C. & Granner, D.K. Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. *Mol. Endocrinol.* **12**, 482-491 (1998).
104. Buetti, E. & Kühnel, B. Distinct sequence elements involved in the glucocorticoid regulation of the mouse mammary tumor virus promoter identified by linker scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **190**, 379-389 (1986).
105. Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H.M. & Beato, M. The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature* **304**, 749-752 (1983).
106. Sakai, D.D. *et al.* Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.* **2**, 1144-1154 (1988).
107. Aslam, F. *et al.* Contributions of distal and proximal promoter elements to glucocorticoid regulation of osteocalcin gene transcription. *Mol. Endocrinol.* **9**, 679-690 (1995).
108. Drouin, J. *et al.* Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* **12**, 145-156 (1993).

109. Yang-Yen, H.F. *et al.* Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**, 1205-1215 (1990).
110. Jonat, C. *et al.* Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-1204 (1990).
111. Schule, R. *et al.* Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226 (1990).
112. Reichardt, H.M. *et al.* DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-541 (1998).
113. Heck, S. *et al.* A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J.* **13**, 4087-4095 (1994).
114. König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J. & Herrlich, P. Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J.* **11**, 2241-2246 (1992).
115. Rogatsky, I., Zarembek, K.A. & Yamamoto, K.R. Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *EMBO J.* **20**, 6071-6083 (2001).
116. Rogatsky, I., Luecke, H.F., Leitman, D.C. & Yamamoto, K.R. Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16701-16706 (2002).
117. Nissen, R.M. & Yamamoto, K.R. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **14**, 2314-2329 (2000).
118. Luecke, H.F. & Yamamoto, K.R. The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NF kappa B to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes Dev.* **19**, 1116-1127 (2005).
119. Drouin, J. *et al.* Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome* **31**, 510-519 (1989).
120. Drouin, J. *et al.* Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5305-5314 (1989).
121. Philips, A. *et al.* Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5952-5959 (1997).
122. Martens, C., Bilodeau, S., Maira, M., Gauthier, Y. & Drouin, J. Protein:protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* **19**, 885-897 (2005).
123. Ericson, J., Norlin, S., Jessell, T.M. & Edlund, T. 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 (1998).

124. Treier,M. *et al.* Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12**, 1691-1704 (1998).
125. Zhang,H. & Bradley,A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**, 2977-2986 (1996).
126. Winnier,G., Blessing,M., Labosky,P.A. & Hogan,B.L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* **9**, 2105-2116 (1995).
127. Takuma,N. *et al.* Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* **125**, 4835-4840 (1998).
128. McKeehan,W.L., Wang,F. & Kan,M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **59**, 135-176 (1998).
129. Dasen,J.S. *et al.* Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* **15**, 3193-3207 (2001).
130. Meyers,E.N., Lewandoski,M. & Martin,G.R. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics* **18**, 136-141 (1998).
131. Kimura,S. *et al.* The *Tebp* 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 (1996).
132. Yamasaki,M., Miyake,A., Tagashira,S. & Itoh,N. Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, 15918-15921 (1996).
133. De Moerlooze,L. *et al.* An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**, 483-492 (2000).
134. Hammerschmidt,M., Brook,A. & McMahon,A.P. The world according to hedgehog. *Trends Genet.* **13**, 14-21 (1997).
135. Treier,M. *et al.* Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* **128**, 377-386 (2001).
136. Karlstrom,R.O., Talbot,W.S. & Schier,A.F. Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target *gli2* affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev.* **13**, 388-393 (1999).
137. Park,H.L. *et al.* Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* **127**, 1593-1605 (2000).
138. Vila,G. *et al.* Expression and function of sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. *J Clin. Endocrinol. Metab* **90**, 6687-6694 (2005).
139. Bray,S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 678-689 (2006).

140. Raetzman, L.T. *et al.* Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev. Biol.* **265**, 329-340 (2004).
141. Chen, J. *et al.* The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* **146**, 3985-3998 (2005).
142. Chen, J., Crabbe, A., Van, D., V & Vankelecom, H. The Notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered 'side population'. *Mol. Endocrinol.* (2006).
143. Zhu, X. *et al.* Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev.* **20**, 2739-2753 (2006).
144. Cha, K.B. *et al.* WNT5A signaling affects pituitary gland shape. *Mech. Dev.* **121**, 183-194 (2004).
145. Kioussi, C. *et al.* Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* **111**, 673-685 (2002).
146. Douglas, K.R. *et al.* Identification of members of the Wnt signaling pathway in the embryonic pituitary gland. *Mamm. Genome* **12**, 843-851 (2001).
147. Wang, J. & Shackelford, G.M. Murine Wnt10a and Wnt10b: cloning and expression in developing limbs, face and skin of embryos and in adults. *Oncogene* **13**, 1537-1544 (1996).
148. Moreno, C.S. *et al.* Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res.* **65**, 10214-10222 (2005).
149. Giacomini, D. *et al.* Bone morphogenetic protein-4 control of pituitary pathophysiology. *Front Horm. Res.* **35**, 22-31 (2006).
150. Lanctôt, C., Lamolet, B. & Drouin, J. The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**, 2807-2817 (1997).
151. Gage, P.J. & Camper, S.A. 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 (1997).
152. Szeto, D.P. *et al.* Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* **13**, 484-494 (1999).
153. Lanctôt, C., Gauthier, Y. & Drouin, J. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* **140**, 1416-1422 (1999).
154. Quirk, C.C., Lozada, K.L., Keri, R.A. & Nilson, J.H. A single Pitx1 binding site is essential for activity of the LHbeta promoter in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **15**, 734-746 (2001).
155. Tremblay, J.J. & Drouin, J. 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 (1999).

156. Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L. & Drouin,J. Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* **126**, 1805-1810 (1999).
157. Semina,E.V. *et al.* Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat. Genet.* **14**, 392-399 (1996).
158. Gage,P.J., Suh,H.Y. & Camper,S.A. Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* **126**, 4643-4651 (1999).
159. Lin,C.R. *et al.* *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401**, 279-282 (1999).
160. Kitamura,K. *et al.* Mouse *Pitx2* deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, e. *Development* **126**, 5749-5758 (1999).
161. Lu,M.F., Pressman,C., Dyer,R., Johnson,R.L. & Martin,J.F. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **401**, 276-278 (1999).
162. Suh,H., Gage,P.J., Drouin,J. & Camper,S.A. *Pitx2* is required at multiple stages of pituitary organogenesis : pituitary primordium formation and cell specification. *Development* **129**, 329-337 (2002).
163. Pfaff,S.L. *et al.* Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-320 (1996).
164. Sheng,H.Z. *et al.* Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* **272**, 1004-1007 (1996).
165. Sheng,H.Z. *et al.* Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* **278**, 1809-1812 (1997).
166. Hermesz,E., Mackem,S. & Mahon,K.A. *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 (1996).
167. Dattani,M.T. *et al.* Mutations in the homeobox gene *HESX1/Hesx1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat. Genet.* **19**, 125-133 (1998).
168. Sornson,M.W. *et al.* Pituitary lineage determination by the Prophet of *Pit-1* homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* **384**, 327-333 (1996).
169. Andersen,B. *et al.* The Ames dwarf gene is required for *Pit-1* gene activation. *Developmental Biology (New York)* **172**(2), 495-503. 1995.
- Ref Type: Journal (Full)
170. Nasonkin,I.O. *et al.* Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in *Prop1* knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2727-2735 (2004).
171. Gage,P.J., Roller,M.L., Saunders,T.L., Scarlett,L.M. & Camper,S.A. Anterior pituitary cells defective in the cell-autonomous factor, *df*, undergo cell lineage specification but not expansion. *Development* **122**, 151-160 (1996).

172. Ward,R.D. *et al.* Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol. Endocrinol.* **19**, 698-710 (2005).
173. Gage,P.J. *et al.* 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 (1996).
174. Wu,W. *et al.* Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* **18**, 147-149 (1998).
175. Fofanova,O. *et al.* Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 2601-2604 (1998).
176. Cogan,J.D. *et al.* The PROP1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 3346-3349 (1998).
177. Fluck,C. *et al.* Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation resulting in the substitution of Arg-->Cys at codon 120 (R120C). *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 3727-3734 (1998).
178. Rosenbloom,A.L. *et al.* Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **84**, 50-57 (1999).
179. Zhu,X., Lin,C.R., Prefontaine,G.G., Tollkuhn,J. & Rosenfeld,M.G. Genetic control of pituitary development and hypopituitarism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 332-340 (2005).
180. Li,X., Perissi,V., Liu,F., Rose,D.W. & Rosenfeld,M.G. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* **297**, 1180-1183 (2002).
181. Li,X. *et al.* Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426**, 247-254 (2003).
182. Ingraham,H.A. *et al.* A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55**, 519-529 (1988).
183. Bodner,M. *et al.* The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55**, 505-518 (1988).
184. Li,S. *et al.* Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* **347**, 528-533 (1990).
185. Camper,S.A., Saunders,T.L., Katz,R.W. & Reeves,R.H. The Pit-1 Transcription Factor Gene Is A Candidate for the Murine Snell Dwarf Mutation. *Genomics* **8**, 586-590 (1990).
186. Olson,L.E. *et al.* Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* **125**, 593-605 (2006).
187. Scully,K.M. *et al.* Allosteric effects of Pit-1 DNA sites on long-term repression in cell type specification. *Science* **290**, 1127-1131 (2000).
188. Parker,K.L. & Schimmer,B.P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* **18**, 361-377 (1997).

189. Ingraham, H.A. *et al.* The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* **8**, 2302-2312 (1994).
190. Shinoda, K. *et al.* Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dynamics* **204**, 22-29 (1995).
191. Zhao, L. *et al.* Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* **128**, 147-154 (2001).
192. Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J.H. & Parker, K.L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* **9**, 478-486 (1995).
193. Tsai, F.Y. *et al.* An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**, 221-226 (1994).
194. Charles, M.A. *et al.* Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1366-1377 (2006).
195. Dasen, J.S. *et al.* Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* **97**, 587-598 (1999).
196. Gordon, D.F. *et al.* Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin β -subunit promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 24339-24347 (1997).
197. Pulichino, A.M. *et al.* Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* **17**, 738-747 (2003).
198. Pulichino, A.M. *et al.* Human and mouse Tpit gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* **17**, 711-716 (2003).
199. Vallette-Kasic, S. *et al.* Congenital isolated adrenocorticotropin deficiency: an underestimated cause of neonatal death, explained by TPIT gene mutations. *J Clin. Endocrinol. Metab* **90**, 1323-1331 (2005).
200. Weintrob, N. *et al.* Low estriol levels in the maternal triple-marker screen as a predictor of isolated ACTH deficiency caused by a new mutation in the TPIT gene. *Pediatrics* **117**, e322-e327 (2005).
201. Costello, R.T. Subclinical adenoma of the pituitary gland. *Am. J. Pathol.* **12**, 205-218 (1936).
202. Ciemerych, M.A. & Sicinski, P. Cell cycle in mouse development. *Oncogene* **24**, 2877-2898 (2005).
203. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **18**, 2699-2711 (2004).
204. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512 (1999).
205. Kozar, K. *et al.* Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, 477-491 (2004).

206. Malumbres,M. *et al.* Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504 (2004).
207. Jordan,S., Lidhar,K., Korbonits,M., Lowe,D.G. & Grossman,A.B. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *Eur. J Endocrinol.* **143**, R1-R6 (2000).
208. Moons,D.S. *et al.* Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* **143**, 3001-3008 (2002).
209. Ohtsubo,M., Theodoras,A.M., Schumacher,J., Roberts,J.M. & Pagano,M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2612-2624 (1995).
210. Tsai,L.H., Lees,E., Faha,B., Harlow,E. & Riabowol,K. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* **8**, 1593-1602 (1993).
211. Geng,Y. *et al.* Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**, 431-443 (2003).
212. Parisi,T. *et al.* Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J* **22**, 4794-4803 (2003).
213. Hwang,H.C. & Clurman,B.E. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**, 2776-2786 (2005).
214. Geng,Y. *et al.* Kinase-independent function of cyclin E. *Mol. Cell* **25**, 127-139 (2007).
215. Petersen,B.O., Lukas,J., Sorensen,C.S., Bartek,J. & Helin,K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* **18**, 396-410 (1999).
216. Coverley,D., Pelizon,C., Trewick,S. & Laskey,R.A. Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci.* **113** (Pt 11), 1929-1938 (2000).
217. Fuchimoto,D., Mizukoshi,A., Schultz,R.M., Sakai,S. & Aoki,F. Posttranscriptional regulation of cyclin A1 and cyclin A2 during mouse oocyte meiotic maturation and preimplantation development. *Biol. Reprod.* **65**, 986-993 (2001).
218. Liu,D. *et al.* Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* **20**, 377-380 (1998).
219. Liu,D., Liao,C. & Wolgemuth,D.J. A role for cyclin A1 in the activation of MPF and G2-M transition during meiosis of male germ cells in mice. *Dev. Biol.* **224**, 388-400 (2000).
220. Murphy,M. *et al.* Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat. Genet.* **15**, 83-86 (1997).
221. Ookata,K., Hisanaga,S., Okumura,E. & Kishimoto,T. Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes. *J Cell Sci.* **105** (Pt 4), 873-881 (1993).
222. Jackman,M., Firth,M. & Pines,J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J* **14**, 1646-1654 (1995).

223. Draviam,V.M., Orrechia,S., Lowe,M., Pardi,R. & Pines,J. The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* **152**, 945-958 (2001).
224. Brandeis,M. *et al.* Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 4344-4349 (1998).
225. Nguyen,T.B. *et al.* Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol. Chem.* **277**, 41960-41969 (2002).
226. Denicourt,C. & Dowdy,S.F. Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* **18**, 851-855 (2004).
227. el Deiry,W.S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825 (1993).
228. Parker,S.B. *et al.* p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267**, 1024-1027 (1995).
229. Harper,J.W. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* **6**, 387-400 (1995).
230. Deng,C., Zhang,P., Harper,J.W., Elledge,S.J. & Leder,P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684 (1995).
231. Martin-Caballero,J., Flores,J.M., Garcia-Palencia,P. & Serrano,M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* **61**, 6234-6238 (2001).
232. Franklin,D.S., Godfrey,V.L., O'Brien,D.A., Deng,C. & Xiong,Y. Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6147-6158 (2000).
233. Ikeda,H., Yoshimoto,T. & Shida,N. Molecular analysis of p21 and p27 genes in human pituitary adenomas. *Br. J Cancer* **76**, 1119-1123 (1997).
234. Polyak,K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9-22 (1994).
235. Toyoshima,H. & Hunter,T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74 (1994).
236. Tsvetkov,L.M., Yeh,K.H., Lee,S.J., Sun,H. & Zhang,H. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* **9**, 661-664 (1999).
237. Besson,A., Gurian-West,M., Schmidt,A., Hall,A. & Roberts,J.M. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* **18**, 862-876 (2004).
238. Fero,M.L. *et al.* A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* **85**, 733-744 (1996).
239. Kiyokawa,H. *et al.* Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* **85**, 721-732 (1996).

240. Nakayama,K. *et al.* Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**, 707-720 (1996).
241. Jirawatnotai,S. *et al.* The cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol. Chem.* **278**, 17021-17027 (2003).
242. Martin,A. *et al.* Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell* **7**, 591-598 (2005).
243. Aleem,E., Kiyokawa,H. & Kaldis,P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell Biol.* **7**, 831-836 (2005).
244. Dahia,P.L. *et al.* Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumours. *Oncogene* **16**, 69-76 (1998).
245. Lidhar,K. *et al.* Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J Clin. Endocrinol. Metab* **84**, 3823-3830 (1999).
246. Levine,E.M., Close,J., Fero,M., Ostrovsky,A. & Reh,T.A. p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev. Biol.* **219**, 299-314 (2000).
247. Chen,P. & Segil,N. p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* **126**, 1581-1590 (1999).
248. White,P.M., Doetzlhofer,A., Lee,Y.S., Groves,A.K. & Segil,N. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* **441**, 984-987 (2006).
249. Zhang,P. *et al.* Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**, 151-158 (1997).
250. Engel,J.R. *et al.* Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med. Genet.* **37**, 921-926 (2000).
251. Hatada,I. *et al.* An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat. Genet.* **14**, 171-173 (1996).
252. Lam,W.W. *et al.* Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med. Genet.* **36**, 518-523 (1999).
253. Reik,W. & Maher,E.R. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet.* **13**, 330-334 (1997).
254. Yan,Y., Frisen,J., Lee,M.H., Massague,J. & Barbacid,M. Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* **11**, 973-983 (1997).
255. Zhang,P., Wong,C., DePinho,R.A., Harper,J.W. & Elledge,S.J. Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev.* **12**, 3162-3167 (1998).

256. Dyer, M.A. & Cepko, C.L. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J. Neurosci.* **21**, 4259-4271 (2001).
257. Georgia, S., Soliz, R., Li, M., Zhang, P. & Bhushan, A. p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors. *Dev. Biol.* (2006).
258. Zhang, P. *et al.* p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* **13**, 213-224 (1999).
259. Buckingham, M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 525-532 (2006).
260. John, R.M., Ainscough, J.F., Barton, S.C. & Surani, M.A. Distant cis-elements regulate imprinted expression of the mouse p57(Kip2) (Cdkn1c) gene: implications for the human disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1601-1609 (2001).
261. Quelle, D.E. *et al.* Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* **11**, 635-645 (1995).
262. Serrano, M. *et al.* Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**, 27-37 (1996).
263. Yoshimoto, K. *et al.* Infrequent mutations of p16INK4A and p15INK4B genes in human pituitary adenomas. *Eur. J Endocrinol.* **136**, 74-80 (1997).
264. Woloschak, M., Yu, A., Xiao, J. & Post, K.D. Frequent loss of the P16INK4a gene product in human pituitary tumors. *Cancer Res.* **56**, 2493-2496 (1996).
265. Latres, E. *et al.* Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J* **19**, 3496-3506 (2000).
266. Franklin, D.S. *et al.* CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev.* **12**, 2899-2911 (1998).
267. Pei, X.H., Bai, F., Tsutsui, T., Kiyokawa, H. & Xiong, Y. Genetic evidence for functional dependency of p18Ink4c on Cdk4. *Mol. Cell Biol.* **24**, 6653-6664 (2004).
268. Morris, D.G. *et al.* Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur. J Endocrinol.* **153**, 143-151 (2005).
269. Zindy, F., van Deursen, J., Grosveld, G., Sherr, C.J. & Roussel, M.F. INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol. Cell Biol.* **20**, 372-378 (2000).
270. Chen, P. *et al.* Progressive hearing loss in mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor Ink4d. *Nat. Cell Biol.* **5**, 422-426 (2003).
271. Zindy, F. *et al.* Control of spermatogenesis in mice by the cyclin D-dependent kinase inhibitors p18(Ink4c) and p19(Ink4d). *Mol. Cell Biol.* **21**, 3244-3255 (2001).
272. Kozar, K. *et al.* Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, 477-491 (2004).
273. Jirawatnotai, S. *et al.* Cdk4 is indispensable for postnatal proliferation of the anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* **279**, 51100-51106 (2004).

274. Sotillo,R. *et al.* Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J* **20**, 6637-6647 (2001).
275. Sotillo,R. *et al.* Cooperation between Cdk4 and p27kip1 in tumor development: a preclinical model to evaluate cell cycle inhibitors with therapeutic activity. *Cancer Res.* **65**, 3846-3852 (2005).
276. Sharpless,N.E. *et al.* Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* **413**, 86-91 (2001).
277. Sharpless,N.E., Ramsey,M.R., Balasubramanian,P., Castrillon,D.H. & DePinho,R.A. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* **23**, 379-385 (2004).
278. Park,M.S. *et al.* p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6382-6387 (1999).
279. Yamasaki,L. *et al.* Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat. Genet.* **18**, 360-364 (1998).
280. Ziebold,U., Lee,E.Y., Bronson,R.T. & Lees,J.A. E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6542-6552 (2003).
281. Lee,E.Y. *et al.* E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice. *Cancer Cell* **2**, 463-472 (2002).
282. Giacinti,C. & Giordano,A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220-5227 (2006).
283. Ortega,S., Malumbres,M. & Barbacid,M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1602**, 73-87 (2002).
284. Clarke,A.R. *et al.* Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**, 328-330 (1992).
285. Lee,E.Y. *et al.* Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359**, 288-294 (1992).
286. Cobrinik,D. *et al.* Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev* **10**, 1633-1644 (1996).
287. Nikitin,A.Y. & Lee,W.H. Early loss of the retinoblastoma gene is associated with impaired growth inhibitory innervation during melanotroph carcinogenesis in Rb+/- mice. *Genes Dev.* **10**, 1870-1879 (1996).
288. Hinton,D.R., Hahn,J.A., Weiss,M.H. & Couldwell,W.T. Loss of Rb expression in an ACTH-secreting pituitary carcinoma. *Cancer Lett.* **126**, 209-214 (1998).
289. Takahashi,Y., Rayman,J.B. & Dynlacht,B.D. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* **14**, 804-816 (2000).

290. Lazzerini,D.E., Attwooll,C., Pasini,D. & Helin,K. Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol. Cell Biol.* **25**, 2660-2672 (2005).
291. Zhang,X. *et al.* Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin. Endocrinol. Metab* **84**, 761-767 (1999).
292. Abbud,R.A. *et al.* Early multipotential pituitary focal hyperplasia in the alpha-subunit of glycoprotein hormone-driven pituitary tumor-transforming gene transgenic mice². *Mol. Endocrinol.* **19**, 1383-1391 (2005).
293. Chesnokova,V., Kovacs,K., Castro,A.V., Zonis,S. & Melmed,S. Pituitary hypoplasia in Pttg-/- mice is protective for Rb+/- pituitary tumorigenesis. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2371-2379 (2005).
294. Donangelo,I. *et al.* Pituitary tumor transforming gene overexpression facilitates pituitary tumor development. *Endocrinology* **147**, 4781-4791 (2006).
295. Bultman,S. *et al.* A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* **6**, 1287-1295 (2000).
296. Helmborg,A., Auphan,N., Caelles,C. & Karin,M. Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **14**, 452-460 (1995).
297. Wintermantel,T.M., Berger,S., Greiner,E.F. & Schutz,G. Genetic dissection of corticosteroid receptor function in mice. *Horm. Metab Res.* **36**, 387-391 (2004).
298. Schüle,R. *et al.* Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226 (1990).
299. Hayashi,R., Wada,H., Ito,K. & Adcock,I.M. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 51-62 (2004).
300. Pascual,G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* **437**, 759-763 (2005).
301. Arnaldi,G. *et al.* Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: A consensus statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 5593-5602 (2003).
302. Vallette-Kasic,S. *et al.* 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 (2003).
303. Lamberts,S.W.J. Glucocorticoid receptors and Cushing's disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **197**, 69-72 (2002).
304. Wong,A.K.C. *et al.* BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res.* **60**, 6171 (2000).
305. Sage,J. *et al.* Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev.* **14**, 3037-3050 (2000).

306. Corey,L.L., Weirich,C.S., Benjamin,I.J. & Kingston,R.E. Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev.* **17**, 1392-1401 (2003).
307. Gagner,J.-P. & Drouin,J. Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **1**, 677-682 (1987).
308. Cho,E.J., Kobor,M.S., Kim,M., Greenblatt,J. & Buratowski,S. Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev.* **15**, 3319-3329 (2001).
309. Cushing,H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hosp* **1932;50**, 137-195 (1932).
310. Meij,B., Voorhout,G. & Rijnberk,A. Progress in transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs and cats. *Mol. Cell. Endocrinol.* **197**, 89-96 (2002).
311. Narlikar,G.J., Fan,H.Y. & Kingston,R.E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487 (2002).
312. Kadam,S. & Emerson,B.M. Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* **11**, 377-389 (2003).
313. Pal,S. *et al.* mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7475-7487 (2003).
314. Seo,S., Richardson,G.A. & Kroll,K.L. The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**, 105-115 (2005).
315. Metivier,R. *et al.* A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol. Cell* **10**, 1019-1032 (2002).
316. Huang,X. & Kadonaga,J.T. Biochemical analysis of transcriptional repression by Drosophila histone deacetylase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 12497-12500 (2001).
317. Svec,F. Glucocorticoids inhibit the growth of AtT-20 mouse pituitary tumor cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **35**, 33-40 (1984).
318. Reisman,D.N., Sciarrotta,J., Wang,W.D., Funkhouser,W.K. & Weissman,B.E. Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: Correlation with poor prognosis. *Cancer Res.* **63**, 560-566 (2003).
319. Gunduz,E. *et al.* Genetic and epigenetic alterations of BRG1 promote oral cancer development. *Int. J. Oncol.* **26**, 201-210 (2005).
320. Drummond,D.C. *et al.* Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 495-528 (2005).
321. van de Wetering,M. *et al.* Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* **4**, 609-615 (2003).

322. Muchardt,C. & Yaniv,M. A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **12**, 4279-4290 (1993).
323. Wang,W. *et al.* Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* **10**, 2117-2130 (1996).
324. Figliola,R. & Maione,R. MyoD induces the expression of p57Kip2 in cells lacking p21Cip1/Waf1: overlapping and distinct functions of the two cdk inhibitors. *J. Cell Physiol* **200**, 468-475 (2004).
325. Lee,Y.S., Liu,F. & Segil,N. A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development. *Development* **133**, 2817-2826 (2006).
326. Charles,M.A., Suh,H., Drouin,J., Camper,S.A. & Gage,P.J. PITX genes are required for cell survival and *Lhx3* activation. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1893-1903 (2005).
327. Asa,S.L. & Ezzat,S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 836-849 (2002).
328. Goodyer,C.G. *et al.* Pitx1 *in vivo* promoter activity and mechanisms of positive autoregulation. *Neuroendocrinol.* **78**, 129-137 (2003).
329. Berger,C., Pallavi,S.K., Prasad,M., Shashidhara,L.S. & Technau,G.M. Cyclin E acts under the control of Hox-genes as a cell fate determinant in the developing central nervous system. *Cell Cycle* **4**, 422-425 (2005).
330. Ward,R.J. & Dirks,P.B. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2**, 175-189 (2007).
331. Rahman,N. Mechanisms predisposing to childhood overgrowth and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 227-233 (2005).
332. Vallette-Kasic,S. *et al.* A neonatal form of isolated ACTH deficiency frequently associated with Tpit gene mutations. *Endocr. Res.* **30**, 943-944 (2004).
333. Dattani,M.T. Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **63**, 121-130 (2005).
334. Karges,B. & de Roux,N. Molecular genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Endocr. Dev.* **8**, 67-80 (2005).
335. Melmed,S. Medical progress: Acromegaly. *N. Engl. J Med.* **355**, 2558-2573 (2006).
336. Charmandari,E., Tsigos,C. & Chrousos,G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol* **67**, 259-284 (2005).
337. Bilodeau,S. *et al.* Role of Brg1 and HDAC2 in GR *trans*-repression of pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes Dev.* **20**, 2871-2886 (2006).
338. Datar,S.A., Jacobs,H.W., de la Cruz,A.F., Lehner,C.F. & Edgar,B.A. The *Drosophila* cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J* **19**, 4543-4554 (2000).
339. Kovacs,K., Horvath,E. & Vidal,S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* **54**, 121-127 (2001).

340. Hendricks, K.B., Shanahan, F. & Lees, E. Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 362-376 (2004).
341. Trivedi, C.M. *et al.* Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3beta activity. *Nat. Med.* (2007).
342. Ferreira, R. *et al.* Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep.* **2**, 794-799 (2001).
343. Bousquet, C. & Melmed, S. Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 10723-10730 (1999).
344. Fukada, T. *et al.* STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J* **17**, 6670-6677 (1998).
345. Nomiya, T. *et al.* The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol. Chem.* **281**, 33467-33476 (2006).
346. White, P.C. *et al.* Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein kinase A and CREB in lymphocytes. *Oncogene* **25**, 2170-2180 (2006).
347. Fabrizio, E. *et al.* Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* **3**, 641-645 (2002).
348. Polanowska, J. *et al.* The periodic down regulation of Cyclin E gene expression from exit of mitosis to end of G(1) is controlled by a deacetylase- and E2F-associated bipartite repressor element. *Oncogene* **20**, 4115-4127 (2001).
349. Chien, W.M. *et al.* Genetic mosaics reveal both cell-autonomous and cell-nonautonomous function of murine p27Kip1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 4122-4127 (2006).
350. Chien, W.M. *et al.* Differential Gene Expression of p27Kip1 and Rb Knockout Pituitary Tumors Associated with Altered Growth and Angiogenesis. *Cell Cycle* **6**, (2007).
351. Scully, K.M. & Rosenfeld, M.G. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* **295**, 2231-2235 (2002).
352. Varrault, A. *et al.* Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev. Cell* **11**, 711-722 (2006).
353. Spengler, D. *et al.* Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J* **16**, 2814-2825 (1997).
354. Pagotto, U. *et al.* The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Res.* **60**, 6794-6799 (2000).
355. Pagotto, U. *et al.* Inhibition of Zac1, a new gene differentially expressed in the anterior pituitary, increases cell proliferation. *Endocrinology* **140**, 987-996 (1999).
356. Metivier, R. *et al.* Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751-763 (2003).

357. Shang,Y., Hu,X., DiRenzo,J., Lazar,M.A. & Brown,M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**, 843-852 (2000).
358. Ito,K., Barnes,P.J. & Adcock,I.M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6891-6903 (2000).
359. Newell-Price,J. Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *J. Endocrinol.* **177**, 365-372 (2003).
360. Mittnacht,S. Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Gen. & Dev.* **8**, 21-27 (1998).
361. Andersson,E. *et al.* Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* **124**, 393-405 (2006).

