



Interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes durant la métamorphose de *Xenopus tropicalis*

Alexis Grimaldi

► To cite this version:

Alexis Grimaldi. Interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes durant la métamorphose de *Xenopus tropicalis*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T020 . tel-01316386

HAL Id: tel-01316386

<https://theses.hal.science/tel-01316386>

Submitted on 17 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE : ED419 BIOSIGNE

LABORATOIRE : ÉVOLUTIONS DES RÉGULATIONS
ENDOCRINIENNES

DISCIPLINE : ENDOCRINOLOGIE / GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 16 Mai 2014 par

Alexis Grimaldi

Interactions croisées entre hormones
thyroïdiennes et glucocorticoïdes durant
la métamorphose de *Xenopus tropicalis*

Directeur de thèse :	Laurent M. Sachs	Directeur de Recherche (CNRS)
Co-directeur de thèse :	Nicolas Buisine	Maître de Conférences (MNHN)

Composition du jury :

Président du jury :	Anne Mantel	Professeur (PUPH)
Rapporteurs :	Vincent Laudet	Professeur (ENS)
	François Tronche	Directeur de Recherche (CNRS)
Examineurs :	Sylvie Dufour	Directeur de Recherche (CNRS)
	Anne Mantel	Professeur (PUPH)

Interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes durant la métamorphose de

Xenopus tropicalis

par

Alexis Grimaldi

Université Paris-Sud

16 Mai 2014

Thèse de Doctorat

Résumé

La métamorphose des amphibiens est le processus rapide et irréversible par lequel un têtard aquatique se transforme en une grenouille respirant à la surface. Cette transition écologique, réminiscente de la période périnatale chez les mammifères, s'accompagne de changements spectaculaires (régime alimentaire, organes locomoteurs, système respiratoire...). Ces modifications morphologiques et physiologiques nécessitent la réponse concertée à un signal hormonal, les HTs (hormones thyroïdiennes), de différents tissus vers des destin parfois opposés : apoptose (dans la queue), prolifération (dans les pattes), et remodelage (dans les intestins et le système nerveux central).

Toutefois, la synchronisation de la réponse des différents tissus fait appel à d'autres signaux hormonaux, et notamment les GCs (glucocorticoïdes). Ces derniers sont également les médiateurs principaux de la réponse au stress. Les processus endocriniens de la métamorphose et la réponse au stress sont fortement couplés. Les GCs peuvent ainsi jouer le rôle d'interface permettant l'intégration de signaux environnementaux au niveau de réseaux de régulation.

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai analysé les transcriptomes des bourgeons de membres postérieurs et de l'épiderme caudal de têtards de *X. tropicalis* (*Xenopus tropicalis*) traités ponctuellement avec des HTs et / ou des GCs. La comparaison de ces deux tissus a permis de caractériser la diversité des profils d'expression des gènes cibles des HTs et des GCs. Il en ressort plusieurs résultats majeurs. Tout d'abord, la diversité des profils d'interactions entre ces deux voies est limitée, et la majorité des types de profils sont communs aux deux tissus. Indépendamment du tissu, certains profils sont caractéristiques de fonctions biologiques spécifiques comme le remodelage de la matrice extracellulaire et le système immunitaire. Les gènes impliqués dans ces fonctions communes aux deux tissus sont cependant différents. Enfin, plusieurs facteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN sont régulés par les deux hormones.

Transcriptional crosstalk between thyroid hormones and glucocorticoids during *Xenopus tropicalis* metamorphosis

by

Alexis Grimaldi

Université Paris-Sud

May 16th 2014

Doctorate of Philosophy

Abstract

Amphibian metamorphosis is the rapid and irreversible process during which an aquatic tadpole transforms into an air breathing adult frog. This ecological transition, reminiscent of the mammalian perinatal period, comes with spectacular changes (diet, locomotor organs, respiratory system...). These morphological and physiological modifications necessitate the properly timed response to a single hormonal signal, the thyroid hormones (TH), in various tissues to lead them to sometimes opposite fates : apoptosis (in the tail), cell proliferation and differentiation (in the limbs) and remodeling (in the intestine and the central nervous system).

However, TH do not act alone. In particular, glucocorticoids (GC) play important roles during this process. They also are the main mediator of the stress response. Endocrine processes of the metamorphosis and the stress response are deeply intertwined. GC can thus act as an interface to integrate environmental inputs into regulatory networks.

During my doctorate, I analyzed the possible transcriptional crosstalks between TH and GC in two larval tissues : the tailfin (TF) and the hindlimb buds (HLB). Comparing these two tissues allowed me to characterize the diversity of TH and GC target gene expression profiles. This resulted in several major results. First, the diversity of the profiles of crosstalk between these two pathways is limited, and the majority of the types of profiles is common to both tissues. Next, independently of the tissues, some profiles are characteristic of specific biological functions such as extracellular matrix remodeling and the immune system. Yet, the genes involved in these shared functions are different between the TF and the HLB. Finally, several factors involved in DNA methylation are subject to a crosstalk between the two hormones.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Laurent Sachs, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné la chance de continuer à m'émerveiller devant ce phénomène fascinant qu'est la métamorphose. Ses conseils avisés, son extrême patience, sa disponibilité et son soutien ont été plus que bienvenus.

Merci à Nicolas Buisine pour sa pédagogie, son ouverture d'esprit et les discussions que l'on a eu, parfois loin de mon sujet de thèse, mais toujours enrichissantes.

Indéniablement, Laurent et Nicolas ont participé à forger (à coups de marteau parfois douloureux) le scientifique et l'humain que suis et serais.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Loïc Ponger et Nicolas Pollet, ce dernier ayant également participé à nous alimenter en têtards.

Je tiens à remercier Barbara Demeneix pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'exprime ma plus grande gratitude à Vincent Laudet et François Tronche pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à l'étude de mon manuscrit.

Je remercie très sincèrement Anne Mantel et Sylvie Dufour d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Merci à Dan Buchholz, avec qui j'ai pu avoir des discussions stimulantes tout au long de son séjour à Paris.

Évidemment, merci à tous les membres du laboratoire.

Je voudrais aussi remercier mes parents pour leur soutien perpétuel, pour m'avoir supporté dans mes passions et pour m'avoir fait découvrir il y a une vingtaine d'années la galerie d'anatomie comparée et la grande galerie de l'évolution. Ces lieux sont désormais plus que spéciaux pour moi.

Enfin, je ne sais pas comment remercier Aurore, qui, malgré la distance, a su me supporter et m'épauler dans des moments difficiles, et qui est pour moi une source d'inspiration constante.

Table des matières

I	Introduction	13
1	Les Hormones Thyroïdiennes	15
1.1	Généralités	15
1.2	Métabolisme et transport des hormones thyroïdiennes	18
1.2.1	Synthèse des hormones thyroïdiennes	18
1.2.2	Transport des hormones thyroïdiennes	20
1.2.3	Contrôle de la production et de la disponibilité des hormones thyroïdiennes	21
1.3	Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes	26
1.3.1	Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, membres de la famille de récepteurs nucléaires	26
1.3.2	Structure des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	30
1.3.3	Dimérisation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	31
1.3.4	Les isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	32
1.3.5	Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes	34
1.3.6	Mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	36
1.3.7	Autres effets des hormones thyroïdiennes	38
1.3.8	Effets sur le transcriptome	41
2	Les Glucocorticoïdes	45
2.1	Généralités	45
2.1.1	Les glandes surrénales	47
2.2	Métabolisme et transport des glucocorticoïdes	49
2.2.1	Synthèse des glucocorticoïdes	49
2.2.2	Transport des glucocorticoïdes	53
2.2.3	Métabolisme local des glucocorticoïdes	53
2.3	Rôles des glucocorticoïdes	54
2.3.1	Rôles Développementaux	54
2.3.2	Actions sur les fluides extra-cellulaires	55
2.3.3	Rôles dans le système immunitaire	55
2.3.4	Rôles dans l'homéostasie et la réponse au stress	56
2.4	Mécanismes d'action des glucocorticoïdes	60

2.4.1	Les récepteurs aux glucocorticoïdes	60
2.4.2	Structure des récepteurs aux glucocorticoïdes	61
2.4.3	Dimérisation des récepteurs aux glucocorticoïdes	63
2.4.4	Les éléments de réponse aux glucocorticoïdes	64
2.4.5	Mécanismes de régulation de l'expression de gènes cibles des glucocorticoïdes	66
2.4.6	Effets non-génomiques des glucocorticoïdes	69
2.4.7	Effets sur le transcriptome	70
II	Objectifs et Stratégies Expérimentales	73
3	Contexte et Objectifs du Projet	75
3.1	Contexte : La période périnatale	75
3.1.1	Une perturbation de la physiologie à la période périnatale peut avoir des effets délétères pour l'organisme	75
3.1.2	Rôles des glucocorticoïdes	76
3.1.3	Rôles des hormones thyroïdiennes	76
3.2	Objectifs	77
3.2.1	Caractérisation des interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes	77
4	Le Modèle de la Métamorphose des Amphibiens	81
4.1	Le développement du Xénope : un modèle de développement des amphibiens Anoures	81
4.1.1	Le développement embryonnaire et l'organogenèse	81
4.1.2	La pré-métamorphose	82
4.1.3	La pro-métamorphose	82
4.1.4	Le climax de la métamorphose	82
4.2	Hormones thyroïdiennes et métamorphose	85
4.2.1	Taux d'hormones thyroïdiennes circulantes au cours du développement du Xénope	85
4.2.2	Compétence des tissus aux hormones thyroïdiennes et diversité d'actions	86
4.3	Rôle des glucocorticoïdes	89
4.3.1	Taux de glucocorticoïdes au cours de la métamorphose	89
4.3.2	Distribution des récepteurs aux glucocorticoïdes	89
4.3.3	Rôles dans les interactions avec l'environnement	91
4.3.4	Rôle du système immunitaire	92
4.4	Interactions croisées entre les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes durant la métamorphose	92
4.4.1	Interactions croisées au niveau de l'axe hypothalamo- hypophyso-thyroïdien	92

4.4.2	Effets du stress sur la métamorphose HT-dépendante	93
4.4.3	Effets sur les désiodases	94
4.4.4	Régulation croisée de l'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux glucocorticoïdes	94
4.4.5	Interactions croisées au niveau d'éléments <i>cis</i> -régulateurs	94
4.5	Utilisation en tant que modèle biologique	95
4.5.1	Effet des hormones thyroïdiennes à la période post-embryonnaire	95
4.5.2	<i>Xenopus tropicalis</i> , un modèle de génomique fonctionnelle	96
4.5.3	Amélioration de l'assemblage et de l'annotation du génome de <i>X. tropicalis</i>	98
5	Stratégies et Démarches Expérimentales	101
5.1	Collection des échantillons biologiques	103
5.1.1	Choix des tissus	103
5.1.2	Traitements hormonaux	104
5.1.3	Extraction des ARN	104
5.2	Séquençage à haut débit des transcrits	105
5.2.1	Principe et justification	105
5.2.2	Implémentation : Construction des banques	107
5.2.3	Contrôles qualités	108
5.3	Traitement des données	108
5.3.1	Élimination de la redondance	109
5.3.2	Rabotage des séquences ("trimming")	109
5.3.3	Positionnement des séquences sur le génome	109
5.3.4	Débruitage et normalisation des données	110
5.3.5	Mesure de l'expression différentielle des gènes	111
5.4	Analyse des données	112
5.4.1	Annotation fonctionnelle automatisée	112
5.4.2	Curation manuelle de l'annotation fonctionnelle	113
III	Résultats	115
6	Caractérisation des interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes dans les bourgeons de membres postérieurs	117
6.1	L'interaction croisée des hormones thyroïdiennes et des glucocorticoïdes dans les pattes postérieures révèle une perturbation des programmes de mise en place du squelette	117
6.1.1	Résumé et portée de l'article	117

6.2	Annotation fonctionnelle automatique des termes enrichis dans les différentes catégories de profils d'expression	150
6.2.1	Analyse globale	150
6.2.2	Analyse des "clusters" spécifiques d'une interaction croisée entre les effets des deux hormones	161
6.3	Curation manuelle des termes	166
7	Caractérisation des interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes dans l'épiderme caudal	177
7.1	Caractéristiques générales	177
7.2	Annotation fonctionnelle automatisée	180
7.3	Annotation fonctionnelle manuelle : complément à la caractérisation automatisée de termes enrichis	197
7.3.1	Annotation manuelle des gènes régulés de façon croisée par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	197
7.3.2	Annotation manuelle des gènes constituant les profils "d'antagonisme"	197
7.3.3	Annotation manuelle des gènes constituant les profils "potentiés"	200
8	Comparaison des profils d'expressions entre l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs	203
8.1	Comparaison globale des programmes transcriptionnels régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	203
8.2	Vieillesse	205
8.3	Les modificateurs post-traductionnels des histones	206
8.4	La méthylation de l'ADN	208
8.5	Métabolisme et signalisation des hormones thyroïdiennes	209
IV	Discussion	215
9	Profils d'expression des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	217
9.1	Une diversité de profils d'expression	217
9.1.1	Tous les profils d'expression ne sont pas dans la nature	217
9.1.2	Un programme commun entre les deux tissus	218
9.1.3	Profils d'expression et compétence pour répondre aux hormones thyroïdiennes et aux glucocorticoïdes	220

9.2	Profils d'expression et mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux corticostéroïdes	224
10	Fonction moléculaire des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes	227
10.1	Comparaison avec des données similaires	227
10.2	Spécificité fonctionnelle de certains profils	228
10.2.1	Rôle sur le système immunitaire	229
10.2.2	Matrice extracellulaire	231
10.2.3	Possibles effets à l'échelle du tissu	232
11	Conséquences fonctionnelles dans l'interaction avec l'environnement	235
11.1	Conséquences en terme d'adaptation	235
11.2	Stress et épigénome	237
12	Conclusions et Perspectives	241
12.1	Conclusions	241
12.2	Perspectives	242
V	Annexes	245
	Annexes	247
A	Publications	247
A- 1	Mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes durant le développement : Lessons retenues des études sur les amphibiens	248
A- 2	Les technologies de séquençage à haut débit vont métamorphoser l'analyse de la fonction des récepteurs aux hormones thyroïdiennes pendant le développement de l'amphibien	260
A- 3	Ré-assemblage et ré-annotation du génome de <i>X. tropicalis</i> pour l'analyse <i>in vivo</i> de ChIA-PET	275

Liste des figures

1.1	Anatomie et histologie de la glande thyroïde	16
1.2	Évolution la signalisation thyroïdienne	17
1.3	Principales fonctions biologiques impliquant les hormones thyroïdiennes	19
1.4	L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien	22
1.5	Réactions de désiodation de base	23
1.6	Isoformes du récepteur aux hormones thyroïdiennes	33
1.7	Éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes	35
1.8	Activation de la transcription d'un gène cible des hormones thyroïdiennes	37
1.9	Mécanismes de répression par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes activés	39
2.1	Principales fonctions biologiques impliquant les glucocorticoïdes . .	46
2.2	Les glandes surrénales	48
2.3	Principales étapes de la stéroïdogénèse	51
2.4	Axe hypothalamo-hypophyso-adrénal	52
2.5	Rôles des 11- β -HSDs dans le métabolisme local des glucocorticoïdes	54
2.6	Réponses physiologiques au stress	57
2.7	Modes d'action généraux des glucocorticoïdes	60
2.8	Isoformes du récepteur aux glucocorticoïdes	62
2.9	Élément de réponse aux glucocorticoïdes	65
2.10	Mécanismes d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes	67
4.1	Changements anatomiques durant la métamorphose du Xénope . .	83
4.2	Niveaux de corticostérone circulant et de abondance des récepteurs aux glucocorticoïdes au cours de la métamorphose	90
4.3	Régulations de l'axe HPT (hypothalamo-hypophyso-thyroïdien) durant la métamorphose	93
5.1	Aspects techniques de la démarche expérimentale	102
5.2	Principe du RNA-Seq	106
6.1	Heatmap groupant 81 clusters de gènes ayant des profils d'expression similaires dans les bourgeons de pattes postérieures	151
6.2	Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons de pattes postérieures	160
6.3	Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons de pattes postérieures	162
6.4	Enrichissement fonctionnel des gènes dont la répression des gènes HT-dépendante est inhibée par les GCs	163

6.5	Enrichissement fonctionnel des gènes dont l'induction des gènes HT-dépendante est inhibée par les GCs.	165
6.6	Enrichissement fonctionnel des gènes dont l'induction T ₃ -dépendante est potentiée par la CORT	165
6.7	Enrichissement fonctionnel des gènes dont la répression T ₃ (3,5,3'-triiodothyronine)-dépendante est potentiée par la CORT (corticotésterone)	171
6.8	Termes enrichis dans les catégories de "potentiation" et "d'antagonisme" dans les bourgeons de membres postérieurs	173
6.9	Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes "antagonisés" dans les bourgeons de membres postérieurs	174
6.10	Termes enrichis dans les catégories de "potentiation" dans les bourgeons de membres postérieurs	175
7.1	MA plot des gènes exprimés dans l'épiderme caudal	178
7.2	Heatmap groupant 81 clusters de gènes ayant des profils d'expression similaires	179
7.3	Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans l'épiderme caudal	189
7.4	Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans l'épiderme caudal	190
7.5	Partitionnement des profils d'expression des gènes de type "potentiation"	191
7.6	Partitionnement des profils d'expression des gènes de type "antagonisme"	192
7.7	Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes réprimés de type "potentiation"	193
7.8	Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes induits de type "potentiation"	194
7.9	Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes présentant une inhibition de l'effet CORT par la T ₃	195
7.10	Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes présentant une inhibition de l'effet T ₃ par la CORT	196
7.11	Termes enrichis dans les catégories de "potentiation" et "d'antagonisme" dans l'épiderme caudal	198
7.12	Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes "antagonisés" dans l'épiderme caudal	199
7.13	Termes enrichis dans les catégories de type "potentiation" dans l'épiderme caudal	201
8.1	Heatmap des profils d'expression des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition	211
8.2	Profils d'expression des gènes impliqués dans le vieillissement	212
8.3	Profils d'expression des gènes impliqués dans la modification d'histones	212
8.4	Profils d'expression des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN	213
8.5	Profils d'expression des gènes impliqués dans la signalisation et le métabolisme des hormones thyroïdiennes	213
12.1	Profils de densité de ChIP-Seq pour la méthylation de H3K4 et TR	243

Liste des tables

1.1	Principales caractéristiques des désiodases	25
1.2	Tissu-spécificité des différentes isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	34
2.1	Effets des glucocorticoïdes dans la réponse au stress	59
4.1	Effets morphologiques et biochimiques survenant durant la métamorphose	84

Première partie

Introduction

Les Hormones Thyroïdiennes

1.1 Généralités

La curiosité et la santé humaine sont les deux principaux catalyseurs sous-jacent au besoin de l'homme d'élargir sa connaissance en science et en biologie. L'historique de la biologie de la glande thyroïde et des HTs (hormones thyroïdiennes) illustre parfaitement cela. Dès l'antiquité en Inde et en Chine, on observait que le goitre (hypertrophie de la glande thyroïdienne) pouvait être soigné en introduisant dans l'alimentation des aliments riches en iode (Niazi *et al.*, 2011). En 1656, l'anatomiste Thomas Wharton donna son nom actuel à la thyroïde sur la base de sa forme réminiscente d'un bouclier (*thyreoeidês* : “semblable à un bouclier long, scutiforme”). Il faudra attendre 1849 pour que le lien formel entre l'iode et la glande thyroïde se tisse. Les efforts se concentrèrent alors sur l'identification des composés pouvant servir de médiateur de la fonction biologique de la glande thyroïde. En 1895, Adolf Magnus-Levy apporta les premiers éléments de réponse en montrant que la consommation d'extrait de glande thyroïde entraînait l'augmentation du métabolisme général (Magnus-Levy, 1895). L'année suivante, E. Baumann montrait que l'iode se concentrait dans la glande thyroïde, mais pas dans les autres tissus (Baumann, 1896).

En 1905, Ernest Starling utilisa pour la première fois le terme “d'hormone” dans une de ses conférences, ouvrant ainsi la voie à l'endocrinologie. Un événement important dans l'histoire des HTs est la mise en évidence en 1912 par Gudernatsch

de leur fonction dans la métamorphose des amphibiens (Gudernatsch, 1912). C'est en effet en donnant des morceaux de glande thyroïde à des têtards et en observant l'induction de leur métamorphose qu'il en déduisit que cet organe produit les HTs. Puis, Edward C. Kendal isolait en 1915 la thyroxine et cette dernière fut synthétisée en laboratoire en 1926 par Charles R. Harington. La T3 qui est considérée comme la forme la plus active fut mise en évidence plus tardivement (Gross et Pitt-Rivers, 1952; Roche, 1952). Depuis, de nombreuses découvertes ont éclairé la fonction biologique des HTs, leurs mécanismes d'action, leur métabolisme par les désiodases et le contrôle de leur production par l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien.

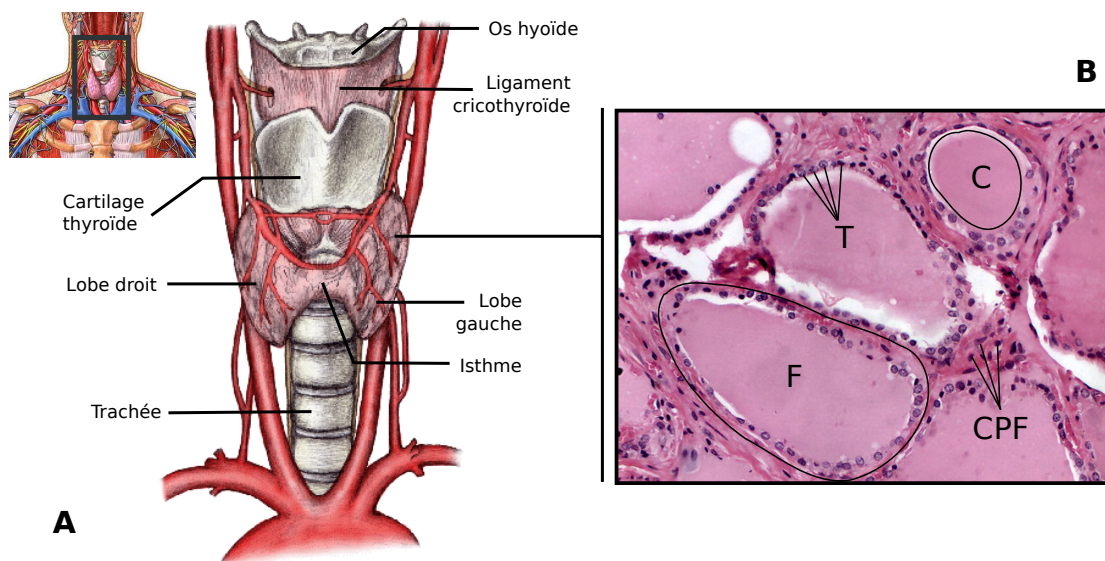


FIGURE 1.1 – Anatomie et histologie de la glande thyroïde. A) La glande thyroïde est située ventralement dans le cou, sous le cartilage thyroïde et autour de la trachée et de l'œsophage. Elle est composée de deux lobes (droit et gauche) reliés par l'isthme. Sur la face dorsale de la glande se situent les glandes para-thyroïdes. B) Trois principales structures histologiques sont impliquées dans la production des HTs. Les follicules (F) sont des structures sphériques entourées d'une couche épithéliale de cellules folliculaire (thyrocytes; T). Le lumen de ces follicules, composé de colloïde (C), sert de lieu de stockage aux précurseurs nécessaires à la synthèse des HTs par les thyrocytes, en particulier de thyroglobuline. Les cellules para-folliculaires (CPF) sont réparties dans les espaces interstitiels entre les follicules, et sécrète la calcitonine. Images tirées des cours en ligne de l'université du Connecticut et du département de biologie de l'université du Massachusetts Amherst.

Les HTs, synthétisées dans la glande thyroïde (Figure 1.1 A) par les thyrocytes (Figure 1.1 B), sont des hormones à la structure conservée au cours de l'évolution. L'analyse de génomes d'échinodermes, de chordés basaux et de vertébrés suggère que la machinerie nécessaire au métabolisme et à la signalisation thyroïdienne est

un caractère ancestral des chordés, voire des deutérostomes (Paris *et al.*, 2008) (Figure 1.2).

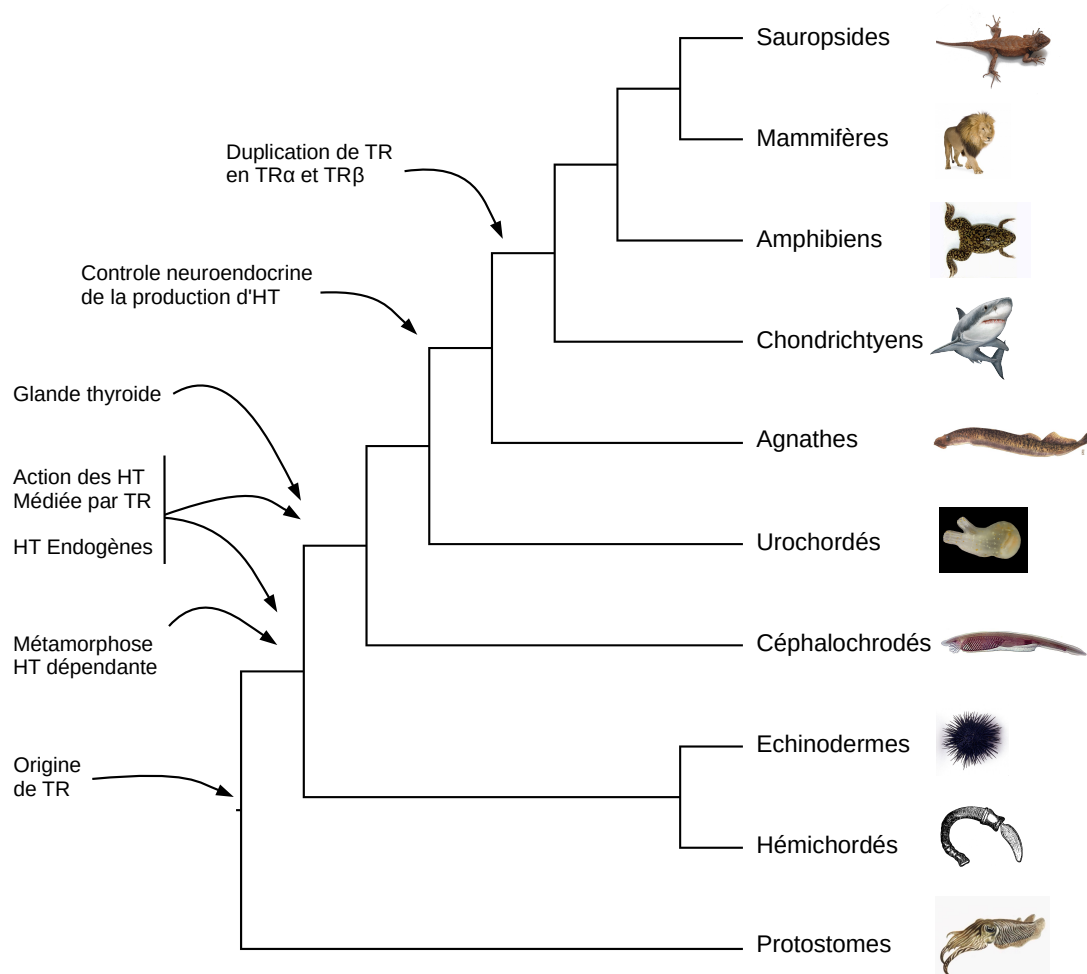


FIGURE 1.2 – Les étapes principales de l'établissement de la signalisation thyroïdienne au cours de l'évolution sont représentées sur cet arbre simplifié. Figure basée sur Paris *et al.* (2008)

Deux rôles des HTs ont co-évolué. Le premier est un rôle durant le développement post-embryonnaire. À la période périnatale chez les amniotes et durant la métamorphose chez les amphibiens et les autres gnathostomes non-amniotes, le taux d'HTs circulant augmente considérablement et transitoirement. Chez tous ces organismes, les HT sont cruciales dans le développement et la maturation de nombreux organes et tissus (Boelaert et Franklyn, 2005), notamment le système nerveux, le système cardiovasculaire, le système digestif, les os (Wojcicka *et al.*, 2013), les organes reproducteurs, les yeux ou encore les oreilles (pour revue voir Wagner *et al.*, 2008; Ojamaa, 2010). Un dysfonctionnement de la signalisation

thyroïdienne à cette période peut ainsi se traduire par des pathologies graves dont les effets délétères perdurent toute la vie de l'individu. Chez l'humain, une hypothyroïdie congénitale (le crétinisme) se traduit entre autre par un retard mental et un retard de la croissance (un faible développement des muscles squelettiques et une ossification du squelette retardée) (Zimmermann, 2009). Au contraire, une hyperthyroïdie congénitale entraîne une thyrotoxicose associée à une ossification prématurée, une croissance retardée, une arythmie cardiaque et tachycardie et dans certains cas une surdité (Krude *et al.*, 1997).

Le second rôle des HTs relève essentiellement de la régulation du métabolisme et de l'homéostasie générale (voir section 1.2). Les HTs agissent sur de nombreux tissus cibles : SNC (système nerveux central), foie (Weitzel *et al.*, 2003), gonades (Wagner *et al.*, 2008), muscles (squelettiques et cardiaque), squelette, tissu adipeux (Figure 1.3). Via leurs effets sur le SNS (système nerveux sympathique), elles vont également avoir un effet important sur l'ensemble des viscères et des glandes endocrines. Certains des effets représentent une autre facette de leur rôle développemental. Le squelette par exemple, est un organe particulièrement dynamique et son remodelage permanent est en partie contrôlé par les HTs (Greenspan et Greenspan, 1999; Wojcicka *et al.*, 2013). Le rôle des HTs sur le métabolisme peut être fortement influencé par des facteurs environnementaux, comme la température ambiante ou la quantité d'énergie assimilée. Elles ont ainsi un rôle crucial dans la thermogenèse (Bianco *et al.*, 2005). En effet, elles régulent d'une part le catabolisme à l'échelle cellulaire et d'autre part les voies oxydatives mitochondriales. La présence et l'activité des graisses brunes sont associés au statut thyroïdien chez la souris (Bianco *et al.*, 2005).

1.2 Métabolisme et transport des hormones thyroïdiennes

1.2.1 Synthèse des hormones thyroïdiennes

Les HTs sont des hormones basées sur la tyrosine et contenant de un à quatre atomes d'iodes. Elles concentrent ainsi la quasi-totalité de l'iode au sein

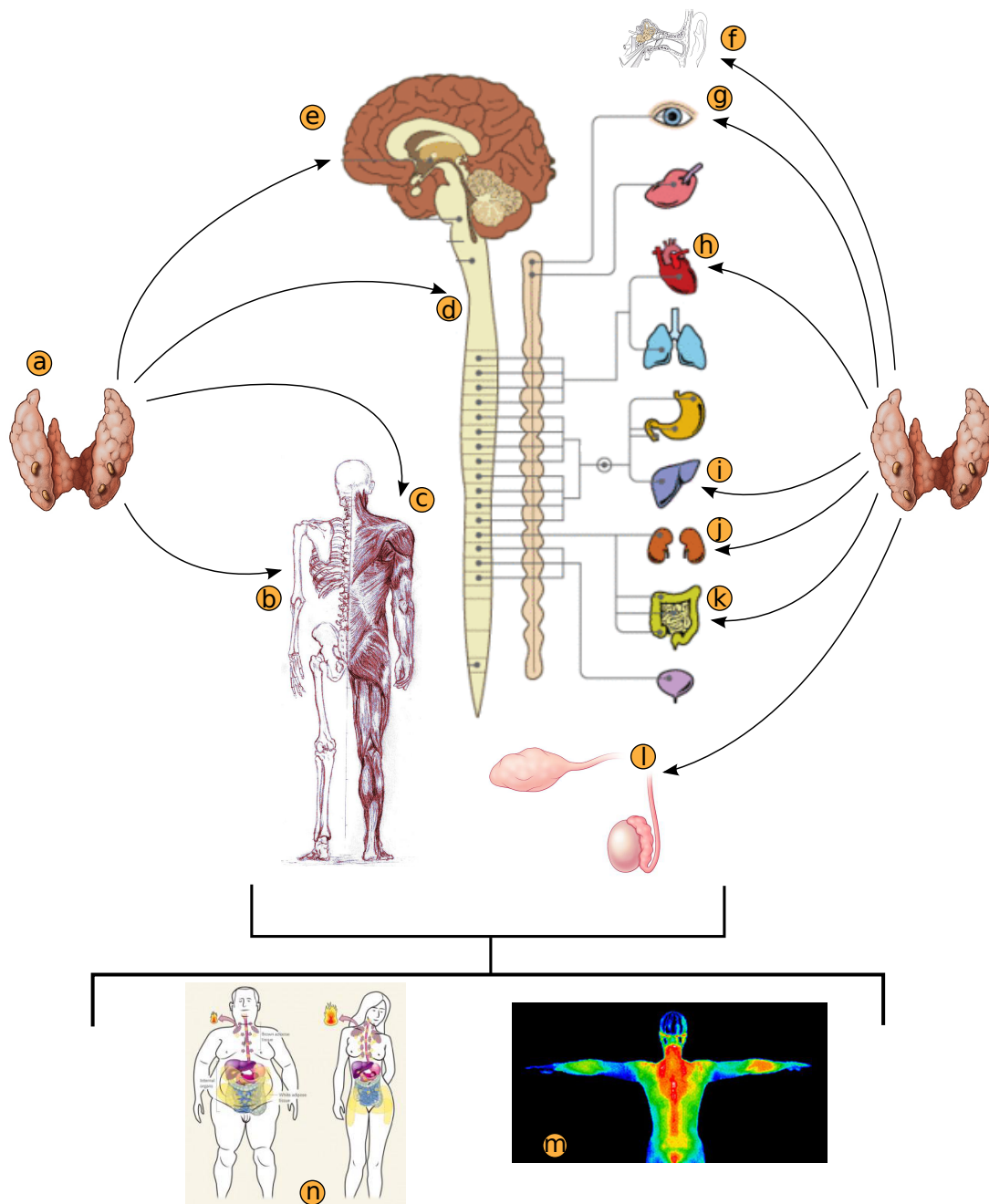


FIGURE 1.3 – Principales fonctions biologiques impliquant les hormones thyroïdiennes. a. Glande thyroïde. b. Métabolisme des os. c. Contraction musculaire. d. Système nerveux sympathique. e. Système nerveux central. f. Audition. g. Vue. h. Système cardiovasculaire. i. Fonctions hépatiques. j. Fonctions rénales. k. Digestion. l. Reproduction. m. Thermogénèse. n. Métabolisme

d'un organisme. Leur production sous forme de T_4 (thyroxine) et de T_3 (3,5,3'-triiodothyronine) est un processus se déroulant en plusieurs étapes :

1. La thyroglobuline est synthétisée par les thyrocytes, des cellules folliculaires de la glande thyroïde et stockée dans la substance colloïde (Lissitzky, 1981 ; Figure 1.1 B).
2. Les groupements phénol des résidus tyrosine de la thyroglobuline sont ensuite mono- ou di- iodés de façon covalente par l'enzyme thyroperoxidase, formant ainsi des résidus MITs (monoiodotyrosines) et DITs (diiodotyrosines).
3. La T_4 est formée par condensation de deux résidus DITs, tandis que la T_3 est formée par condensation d'un résidu MIT et un résidu DIT.
4. La stimulation des thyrocytes par la TSH (thyroestimuline hypophysaire) engendre l'endocytose de la colloïde et la protéolyse des thyroglobulines iodées afin d'en libérer la T_3 et la T_4 (pour revue Rousset, 2003). Celles-ci sont relarguées liées à des protéines de transport (voir sous-section 1.2.2) dans la circulation sanguine afin d'agir sur les tissus cibles.

1.2.2 Transport des hormones thyroïdiennes

1.2.2.1 Transporteurs sanguins

Les HTs sont des molécules hydrophobes relativement peu stables. Afin de les stabiliser et d'augmenter leur temps de demi-vie, la quasi-totalité des HTs plasmatiques sont liées à des protéines de transport, dont les plus importantes sont la TTR (transthyrétine) (Palha, 2002), l'albumine et la TBG (globine liant la thyroxine, "thyroxine binding globin") (Schussler, 2000). Cette dernière lie avec une grande affinité la majorité de la T_3 et T_4 circulante. Malgré sa faible concentration plasmatique, elle reste souvent peu saturée. L'albumine, au contraire, a une affinité moindre, mais est présente en grandes quantités dans la circulation sanguine, ce qui lui confère également un rôle majeur. Au niveau des tissus cibles, les HTs sont découplées de leurs transporteurs car seule la fraction libre peut pénétrer les cellules (Ekins *et al.*, 1994).

1.2.2.2 Transporteurs membranaires

Jusque dans les années 1970, il était supposé que les HTs pénétraient la membrane cytoplasmique des cellules cibles par simple diffusion. Cette hypothèse se basait sur la nature lipophile des HTs. Les premiers indices d'un transport actif des HTs à travers la membrane ont été fournis par Christensen *et al.* (1954), puis par Rao *et al.* (1976). Plusieurs études indépendantes ont depuis mis en évidence une pléthore de transporteurs, la majorité étant Na (sodium)- et ATP (adénosine triphosphate)-dépendants. Les mieux décrits sont les OATPs (polypeptides transporteurs d'anions organiques, "organic anions transporter polypeptides") et les MCTs (transporteurs d'ions monocarboxylate, "monocarboxylate transporters").

Les OATPs représentent une grande famille de protéines de transport Na-indépendant multispécifiques de composés amphiphatiques organiques. Cette multispécificité de substrat souligne l'importance que les OATPs possèdent dans un contexte de détoxification. Plus de 40 membres ont été caractérisés à ce jour, chacun d'eux étant plus ou moins HTs- et tissu-spécifique. En particulier, OATP1C1 possède une forte affinité pour la T_4 et la rT_3 (3,3',5'-triiodothyronine).

Les MCTs doivent leur nom au fait qu'elles ont initialement été caractérisées comme assurant le transport de lactate, pyruvate et de corps cétoniques. Ce sont des symporteurs de protons et leur efficacité est en conséquence dépendante du pH. Parmi les 14 MCTs identifiées à ce jour, seules MCT8 et MCT10 ont été décrites comme des transporteurs très spécifiques des HTs (Friesema *et al.*, 2003, 2008).

1.2.3 Contrôle de la production et de la disponibilité des hormones thyroïdiennes

Chez l'humain au sein des tissus, la T_4 est 3 à 5 fois plus abondante que la T_3 (Laurberg, 1984). Elles agissent au niveau de nombreux tissus cible et jouent un rôle important dans l'homéostasie générale. La quantité d'HTs dans l'organisme, qui se doit d'être finement régulée, est ainsi modulée à deux niveaux.

1.2.3.1 L'axe HPT (hypothalamo-hypophyso-thyroïdien)

La synthèse de T_3 et T_4 et la sécrétion de thyroglobuline dans le colloïde par les thyrocytes sont déclenchées par la TSH (Vagenakis *et al.*, 1973). Cette dernière est une hormone et une glycoprotéine sécrétée par les cellules thyrotropes de l'antéhypophyse. Sa production et sa sécrétion sont activées par la TRH (thyrolibérine) (Halász et Pupp, 1965). La TRH est produite par les neurones médians de la zone para-ventriculaire de l'hypothalamus. L'axe HPT intègre ces trois organes dans une boucle de rétro-contrôle négatif par la T_3 et la T_4 , ces dernières inhibant la synthèse de TSH (Larsen, 1982) et de TRH (Koller *et al.*, 1987) (Figure 1.4). Ce type de régulation vise à maintenir des niveaux d'HTs constants.

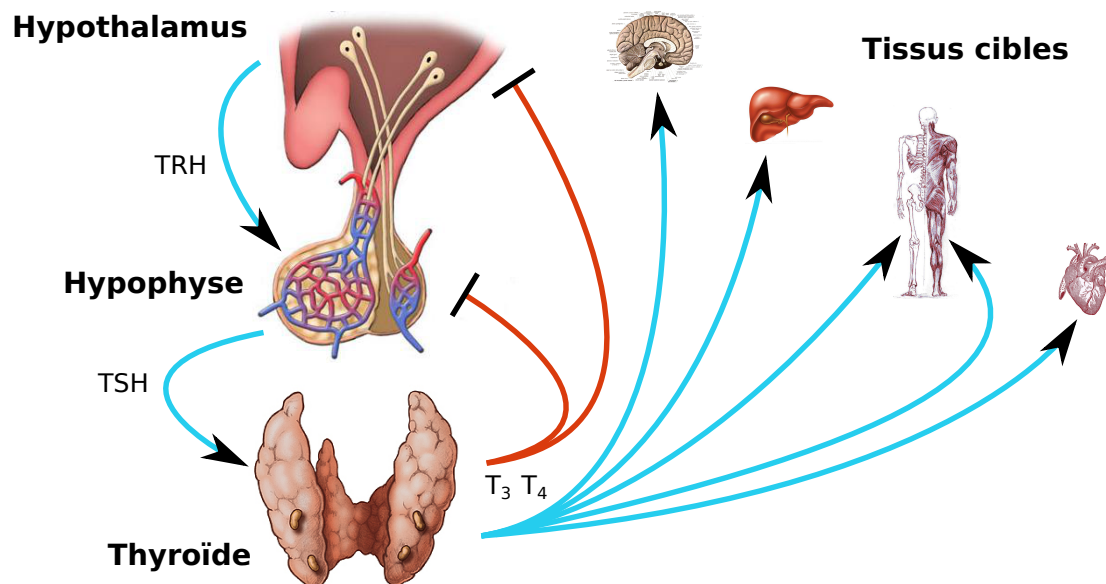


FIGURE 1.4 – La synthèse et la sécrétion d'HTs par la thyroïde sont stimulées par la TSH, produite au niveau de l'antéhypophyse. La stimulation de la synthèse de la TSH est elle-même sous le contrôle de la TRH, produite par l'hypothalamus. La T_3 et la T_4 exercent un rétro-contrôle négatif sur ce système en inhibant la synthèse de TSH et de TRH.

1.2.3.2 Les désiodases

Alors que l'axe HPT permet la régulation des niveaux systémiques en HTs, la disponibilité locale en hormone biologiquement active est modulée directement dans les tissus cibles (Bianco et Kim, 2006). La glande thyroïde synthétise la totalité de la T_4 , mais seulement 10 à 20 % de la T_3 (Laurberg, 1984). Au sein des tissus

cibles, la conversion entre les différentes formes des HTs est assurée par des enzymes spécialisées, les désiodases.

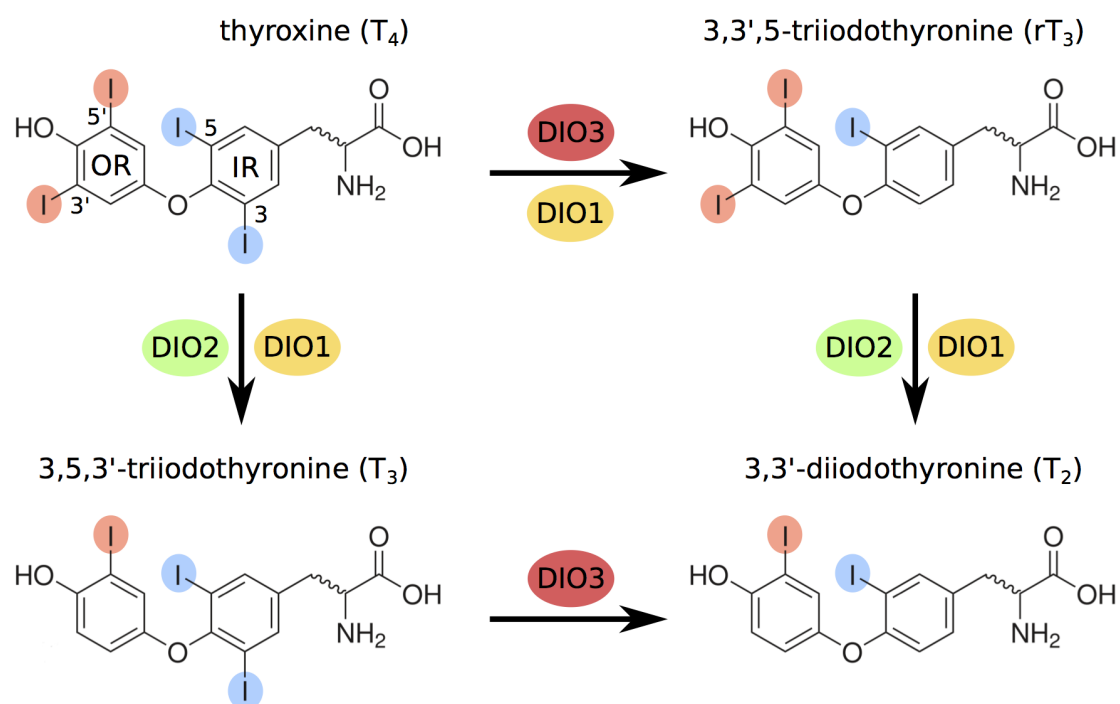


FIGURE 1.5 – Les réactions catalysées par les désiodases retirent les atomes d'iode (sphères rouges et bleues) du cycle externe (groupement phénol, positions 3' et 5', sphères rouges) ou du cycle interne (groupement tyrosine, positions 3 et 5, sphères bleues). Ces voies peuvent activer la T_4 en la transformant en T_3 (via DIO1 (désiodase de type I) ou DIO2 (désiodase de type II)) ou en l'empêchant d'être activée en la convertissant en la forme métaboliquement inactive rT_3 (via DIO1 ou DIO3 (désiodase de type III)). La 3,3'- T_2 (3,3'-diiodothyronine) est un produit commun aux deux voies, peu actif et rapidement métabolisé.

Les désiodases sont des sélénoprotéines peroxydases, catabolisant la substitution d'un atome d'iode par un atome d'hydrogène. La T_3 est majoritairement obtenue au niveau des tissus cibles par ORD (désiodation du cycle externe, "outer ring deiodination") en position 5' de la pro-hormone T_4 . Cette réaction irréversible est assurée en partie par la DIO2 (pour revue Williams et Bassett, 2011) et correspond à une activation des HTs (Figure 1.5). La DIO3 peut également exercer sur la T_3 et la T_4 une activité IRD (désiodation du cycle interne, "inner ring deiodination") en position 5. Les métabolites qui en résultent, respectivement la rT_3 et la 3,3'- T_2 , sont très biologiquement actifs (bien qu'une action de la 3,3'- T_2 passant par TR (récepteur aux HTs) ait été suggérée Mendoza *et al.*, 2013). Ceci fait de la DIO3 une enzyme essentiellement inactivante (Figure 1.5). La première désiodase à avoir

été caractérisée, la DIO1, peut aussi bien activer les HTs (T_4 à T_3) qu'empêcher leur activation (T_4 à rT_3). Compte tenu que son substrat préférentiel est la rT_3 , la DIO1 semble avoir un rôle important dans la clairance des HTs (Maia *et al.*, 2011), le recyclage de l'iode contenu dans les métabolites des HTs (Schneider *et al.*, 2006) et la biosynthèse de thyronamines. Ces dernières sont des composés dont les effets peuvent s'opposer à ceux des HTs, en particulier dans le contrôle de l'activité cardiaque et de la thermogénèse (Scanlan *et al.*, 2004).

De part leur importance dans le cadre de la régulation de la quantité d'HTs actives, elles sont à l'origine de nombreux syndromes métaboliques (Tableau 1.1)

1.2.3.3 La conjugaison

Les HTs peuvent être conjuguées (sulfonylation et glucuronidation) au niveau du résidu hydroxyle du cycle externe. Ces réactions sont particulièrement associées à la détoxification de xénobiotiques et participent à augmenter leur solubilité dans l'eau. Dans le contexte des HTs, ces processus peuvent participer à leur clairance et élimination.

La glucuronidation des HTs est assurée par les enzymes hépatiques UDP-glucuronyl-transférases, ce qui facilite leur excrétion *via* la bile (Visser *et al.*, 1996). Une partie des HTs conjuguées peut être réutilisée par l'organisme par hydrolyse du groupement glucuronide. Certains tissus semblent stocker les HTs sous forme conjuguée, suggérant que la glucuronidation puisse représenter un niveau de régulation supplémentaire de l'action des HTs (van der Heide *et al.*, 2007).

La sulfonylation, quant à elle, affecte les réactions de désiodation des HTs. En effet, cette réaction contribue à inhiber les actions de DIO2 et DIO3, tout en favorisant l'activité ORD de DIO1 (Visser *et al.*, 1990). Les métabolites sulfonylés des HTs sont rapidement dégradés, faisant de cette réaction un mécanisme de protection contre des niveaux toxiques d'HTs. Dans des cas pathologiques de type hypothyroïdie associés à une faible activité de DIO1, la T_3 sulfonylée n'est pas dégradée et constitue une réserve mobilisable d'HTs et d'iode (pour revue, voir Visser, 1994).

Paramètre	DIO1	DIO2	DIO3
Propriétés biochimiques			
Substrats préférentiels (position)	rT ₃ (5')	T ₄ rT ₃	T ₄ T ₃
Demi-vie	Plusieurs heures	20 minutes	Plusieurs heures
Localisation sub-cellulaire	Membrane plasmique	Réticulum endoplasmique	Membrane plasmique
Tissus préférentiels			
	Foie, rein	Système nerveux central, hypophyse, tissu adipeux brun, placenta	Placenta, système nerveux central
Réponse à des taux élevés de T₃ et T₄			
Transcriptionnelle	↑↑	↓	↑↑
Post-traductionnelle	?	↓↓↓ (Ubiquitination)	?
Régulations physiologiques			
Induction	T ₃	Froid, suralimentation, catécholamines, acides biliaires, cAMP	T ₃ , lésions tissulaires, TGF, FGF, EGF, PDGF, activateurs de ERK
Répression	Jeûne, maladie	T ₃ , T ₄ , Hedgehog	GCs, hormones de croissance
Rôles physiologiques			
	Clairance de la rT ₃	Thermogénèse, développement, fournit la T ₃ intracellulaire, source majeure de T ₃ plasmaticque	Développement, clairance de T ₃ et T ₄ , empêche l'accumulation de T ₃ intracellulaire
Rôles dans des contextes pathologiques			
	Source principale de T ₃ circulante chez les patients hyperthyroïdiens	?	Hypothyroïdisme "consommant", clairance de la T ₃ et la T ₄ accrue chez les femmes enceintes

TABLE 1.1 – Principales caractéristiques des désiodases. Adapté de Bianco et Kim (2006)

1.3 Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes

Les premiers indices des effets des hormones sur la transcription furent apportés dans les années 1960 par l'observation de renflements ("puffs") de chromosomes polytènes lors d'un traitement aux ecdystéroïdes (hormones de la métamorphose et de la mue chez les insectes) (Clever et Karlson, 1960). Dans les années 1963, J.R. Tata montrait que les HTs favorisaient la synthèse d'ARN (acide ribonucléique) conjointement à l'augmentation du métabolisme cellulaire. Pendant les années 1970, les travaux de Samuels et Tsai (1973) ont participé à l'identification de sites protéiques de liaisons aux HTs retrouvés dans des fractions nucléaires. Il a donc été supposé que les HTs agissaient via un ou plusieurs récepteurs spécifiques présents dans le noyau.

1.3.1 Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, membres de la famille de récepteurs nucléaires

1.3.1.1 Propriétés des récepteurs nucléaires

Les RNs (récepteurs nucléaires) sont des facteurs de transcription caractérisés par leur localisation nucléaire (au moins transitoire) nécessaire à leur action sur la régulation de l'expression de gènes cibles. Les RNs sont en général activés par la liaison à un ligand, souvent une petite molécule lipophile. Il existe cependant des RNs qualifiés d'orphelins pour lesquels aucun ligand n'a été mis en évidence (pour revue, Giguère, 1999) et dont l'activation passerait directement par des modifications post-traductionnelles. La liaison du ligand (et/ou les modifications post-traductionnelles) entraîne un changement de conformation du récepteur qui modifie sa compétence à lier l'ADN (acide désoxyribonucléique) et/ou à recruter des complexes co-régulateurs. Les RNs agissent souvent (mais pas exclusivement) en formant des homomères ou des hétéromères avec d'autres RNs. Ils modulent tous l'expression de gènes cibles en se fixant à l'ADN au niveau de séquences *cis*-régulatrices, les "éléments de réponse". Ces derniers sont composés de un ou

deux demi-sites caractérisés par trois paramètres :

- Une séquence canonique d'un demi-site de 4 à 8 pb (paires de bases)
- L'orientation des deux demi-sites : répétition directe, palindrome ou palindrome inversé.
- Le nombre de paire de bases séparant les deux demi-sites.

1.3.1.2 Classification des récepteurs nucléaires

Les RNs peuvent être classés en 7 sous-familles selon la similitude de séquence de leurs domaines de liaison à l'ADN et au ligand (Laudet, 1997; Committee, 1999). Une étape indispensable à cette mesure réside dans la connaissance et la caractérisation de leur séquence. Dans les années 1980, de nombreux travaux ont mené à la caractérisation de plusieurs de ces RNs. En particulier, le GR (récepteur aux GCs) et le ER (récepteur aux œstrogènes) ont été clonés sur la base cribles de banques (Hollenberg *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1986). Les autres RNs ont, pour la plupart, été caractérisés selon une approche similaire. De façon indirecte cette classification discrimine au moins partiellement leur modalités de liaison à l'ADN, de dimérisation et le type de ligand qui les active :

Sous-famille 1 : famille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes Les RNs de la sous-famille 1 sont séquestrés dans le noyau même en absence de ligand, souvent sous forme hétérodimérique avec RXR (récepteur à l'acide 9-*cis*-rétinoïque). Ils interagissent alors avec des complexes co-répresseurs afin de réprimer l'expression de gènes cibles. En présence de ligand, leur conformation change et ils recrutent des complexes co-activateurs pour induire l'expression de gènes cibles. Ce groupe rassemble TR, RAR (récepteur à l'acide 9-*cis*-rétinoïque), VDR (récepteur à la vitamine D), PPAR (récepteur activé par les proliférateurs de peroxisomes, "peroxisome proliferator activated receptor"), ainsi que des RNs orphelins reliés aux rétinoïdes. Ils se fixent en général au niveau de DR4s (répétitions en tandem séparées par 4 pb, "direct repeats separated by 4 bp").

Sous-famille 2 : famille des récepteurs aux rétinoïdes X La sous-famille 2 regroupe RXR, COUP-TF (facteur de transcription du promoteur en amont

de l'ovalbumine de poulet, "chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor") et HNF-4 (facteur nucléaire hépatique 4, "hepatic nuclear factor 4"). Sauf pour RXR, ils se lient à l'ADN préférentiellement au niveau de répétitions directes sous forme d'homodimères.

Sous-famille 3 : famille des récepteurs stéroïdiens Les RNs de la sous-famille 3 lient des hormones stéroïdes, dont les GCs, les MCs (minéralocorticoïdes) et les hormones sexuelles. Ces RNs sont en général séquestrés dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes comme HSP90 (protéine de choc thermique de 90 kDa, "heat-shock protein, 90 kDa") en absence de ligand, transloqués dans le noyau sous forme d'homodimères en présence de ligand et se lient préférentiellement au niveau de IR3s (palindromes séparés par 3 pb, "inverted repeats separated by 3 bp").

Sous-famille 4 : famille des récepteurs similaires au facteur de croissance nerveuse La sous-famille Nur regroupe des RNs orphelins similaires à NGF-1B (facteur de croissance nerveuse 1 B, "nerve growth factor 1 B"), les deux autres membres étant NURR-1 (protéine reliée aux récepteurs nucléaires 1, "nuclear receptor related 1 protein") et NOR-1 (récepteur orphelin-1 dérivé du neurone, "neuron-derived orphan receptor 1"). Ce sont des gènes dont l'expression est induite précocement en réponse à un stimulus et ils agissent comme facteurs de transcription activés indépendamment de la liaison à un ligand.

Sous-famille 5 : Récepteurs aux facteurs stéroïdogéniques Cette famille regroupe SF-1 (facteur stéroïdogénique 1, "steroidogenic factor 1") et LRH-1 (homologue-1 du récepteur hépatique, "liver receptor homologue-1"), dont les ligands sont des phosphatidylinositols. Ils sont impliqués dans le développement des organes reproducteurs.

Sous-famille 6 : Facteurs nucléaires de cellules germinales Cette petite famille n'est constituée que de GCNF (facteur nucléaire des cellules germinales, "germ cell nuclear factor") qui est impliqué dans la différenciation des cellules germinales. Ce récepteur ne possède pas de ligand connu et se fixe à l'ADN sous

forme d'homodimères.

Sous-famille 0 : Facteurs divers La sous-famille 0 regroupe DAX1 et SHP qui ne comportent pas le domaine nécessaire à la liaison à l'ADN et jouent le rôle de répresseur d'autres RNs en formant des hétérodimères inactifs.

1.3.1.3 Évolution des récepteurs nucléaires

Les RNs sont très répandus chez tous les métazoaires, mais avec une diversité parfois hétérogène entre différentes espèces. Alors que 48 sont dénombrés chez l'humain (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001), 21 ont été dénombrés chez *Drosophila melanogaster* et plus de 270 chez *Caenorhabditis elegans* (pour revue, voir Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). Cette diversité de la répartition des RNs chez les métazoaires s'explique par des événements locaux (duplications segmentaires ou en tandem) ou à plus grande échelle (duplications du génome entier, réarrangements chromosomiques ...).

La multiplication des RNs, aidée par ces événements classiques de l'évolution des génomes, s'est également accompagnée d'une diversification de leurs fonctions, en particulier via l'émergence de nouveaux couples récepteurs/ligands. Actuellement, deux modèles principaux proposent d'expliquer cette co-évolution. Le premier, l'exploitation de ligands, proposé par Thornton (2001), suggère que la diversification des RNs (en particulier ceux de la sous-famille 3) soit basée sur l'utilisation d'intermédiaires métaboliques ou de métabolites dans les voies de biosynthèse des stéroïdes en tant que ligands. Le second, proposé par Escriva *et al.* (2006), suggère le perfectionnement de la spécificité de liaison du ligand au RN par mutation dans la séquence de son domaine de liaison au ligand. De façon intéressante, ces deux mécanismes ne sont pas mutuellement incompatibles, différentes familles de RNs étant soumises à des pressions de sélection différentes.

1.3.1.4 Identification des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

De nombreux travaux visant à élucider les mécanismes d'action des HTs furent conduits dans les années 1980 en mesurant l'effet des HTs et des GCs sur la transcription du gène de la GH (hormone de croissance, "growth hormone") . En

1984, Nyborg montra que l'induction de la transcription de la GH par la T₃ était dépendante d'un récepteur interagissant potentiellement avec le GR (Nyborg *et al.*, 1984).

Grâce à sa similitude de séquence avec *v-erbA* (oncogène du virus de l'érythroblastose aviaire), GR et ER, un premier TR a pu être cloné et identifié comme *c-erbA* (homologue cellulaire de l'oncogène du virus de l'érythroblastose aviaire) et comme correspondant à TR α (TR, type α) (Sap *et al.*, 1986; Weinberger *et al.*, 1986). Un second TR (TR β (TR, type β)) a ensuite été identifié comme un autre homologue cellulaire de *v-erbA* (Thompson *et al.*, 1987).

1.3.2 Structure des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Les TRs, comme tout autre RNs, sont constitués de cinq domaines principaux :

Le domaine A/B Le domaine A/B constitue la partie N-terminale de la séquence. Il contient le domaine AF-1 (domaine d'activation de la transcription ligand-indépendant, "activation function-1") dont l'action est d'assurer un taux de transcription basale.

Le domaine C Le domaine C contient le DBD (domaine de liaison à l'ADN, "DNA binding domain") qui est constitué de deux structures tertiaires en "doigts de zinc". Chacune est composée de quatre cystéines autour d'un atome de zinc (Evans et Hollenberg, 1988). Une "boîte P" (séquence d'acides aminés EGCKG) se situe sur le premier doigt de zinc. Une "boîte A" est en aval du second. Elle sont impliquées dans la spécificité de liaison de TR à l'ADN au niveau de ses éléments de réponse spécifiques (Nelson *et al.*, 1993). Deux surfaces de dimérisation (notamment avec RXR) ont été décrites comme correspondant à l'arginine de la "boîte D" sur le deuxième doigt de zinc et la "boîte T" en aval des doigts de zinc (pour revue Bain *et al.*, 2007).

Le domaine D Le domaine D est une région charnière qui donne des degrés de liberté dans la conformation des RNs. Il favorise l'hétérodimérisation et intervient dans la spécificité de liaison à l'ADN (Miyamoto *et al.*, 2001). De plus, il contient

une séquence de localisation nucléaire (Hamy *et al.*, 1992). Enfin, il interagit avec certains des partenaires nécessaires à l'activité transcriptionnelle des TRs (Lin *et al.*, 1991; Hörlein *et al.*, 1995).

Le domaine E/F Il contient le LBD (domaine de liaison du ligand, “ligand binding domain”) et est composé de 12 hélices α (H1 à H12) et de quatre feuillets β dont la “boîte I”. Celle-ci est constituée de répétitions d'acides aminés formant une poche hydrophobe qui permet la fixation de la T_3 . C'est le groupe hydroxyle du ligand situé en 4' (voir Figure 1.5) qui rend possible la liaison de l'hormone au LBD. Il joue le rôle de donneur et accepteur d'hydrogène (Dietrich *et al.*, 1977). La présence en 5' (voir Figure 1.5) d'un atome autre que l'hydrogène affecte la reconnaissance du ligand, expliquant l'affinité inférieure pour la T_4 ou la rT_3 . La fixation de la T_3 induit un changement de conformation du TR. L'hélice H12 (la plus proche de l'extrémité C-terminale) verrouille alors la poche hydrophobe. Le LBD participe également à l'hétérodimérisation avec RXR (Wagner *et al.*, 1995; Bain *et al.*, 2007) et pourrait l'être aussi dans la liaison à l'ADN (Figueira *et al.*, 2010). Enfin, le LBD est fortement impliqué dans le mécanisme d'action génomique des TRs et comporte le domaine AF-2 (domaine d'activation de la transcription ligand-dépendant, “activation function-2”) (Barettino *et al.*, 1994; Tone *et al.*, 1994).

1.3.3 Dimérisation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Les TRs ont la particularité de pouvoir se lier à l'ADN sous forme de monomères (Schröder *et al.*, 1994), d'homodimères ou d'hétéro-dimères. Voir pour revue Ikeda *et al.* (1994). En outre, alors que l'homodimérisation de TR peut être déstabilisée par la liaison de la T_3 , cette dernière n'influe pas sur l'hétérodimérisation avec RXR. Il a été montré que l'action transactivatrice de TR se révélait dans le contexte d'une hétérodimérisation avec les différentes formes de RXR (RXR α , RXR β , RXR γ) (Umesono *et al.*, 1988; Mangelsdorf *et al.*, 1990; Kliewer *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992), sans toutefois que l'hétérodimère ne soit sensible aux ligands de RXR. L'hétérodimérisation de plusieurs RNs et en particulier avec RXR, est un mécanisme permettant la régulation par compétition de leur activité

transactivatrice. La majeure partie de ces résultats historiques a été obtenue à partir d'expériences *in vitro* et sur un petit nombre de cibles. Les concepts sous-tendus gagneraient très probablement à être revisités dans des contextes *in vivo* à l'aide de technologies modernes.

1.3.4 Les isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Chez les vertébrés, deux gènes codent pour les TRs : TR α et TR β . L'épissage alternatif de ces deux gènes permet la production de plusieurs formes. Au total, quatre formes de TR α (TR α 1, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ (TR, type α forme Δ)1 et TR $\Delta\alpha$ 2) et cinq formes de TR β (TR β 1, TR β 2, TR β 3, TR $\Delta\beta$ (TR, type β forme Δ)3, TR β 4) ont été mises en évidence. Chez l'humain, seules les isoformes 1, 2 et 4 de TR β ont été caractérisées, alors que TR β 3 et TR $\Delta\beta$ 3 sont spécifiques du rat (Williams, 2000).

Parmi les isoformes de TR α , seule TR α 1 possède un LBD et un DBD complets et fonctionnels (Figure 1.6 A). TR α 2 est une forme tronquée et, bien qu'elle soit localisée dans le noyau et soit capable de lier l'ADN, son LBD n'est pas fonctionnel, lui donnant un rôle d'antagoniste (Chassande *et al.*, 1997). Les isoformes TR $\Delta\alpha$ 1 et 2 ne lient ni la T₃ ni l'ADN (ces deux domaines sont tronqués), mais peuvent toutefois former des hétérodimères avec les autres formes et avec RXR. Elles agiraient donc comme dominants négatifs, régulant négativement les autres isoformes (Plateroti *et al.*, 2001).

Les trois isoformes 1, 2 et 3 de TR β sont fonctionnelles (elle lient l'hormone, l'ADN et sont localisées dans le noyau) malgré leurs différences dans le domaine N-terminal. Tout comme les isoformes tronquées de TR α , TR $\Delta\beta$ 3 ne possède pas de DBD et son LBD est tronqué (Figure 1.6 B). TR β 4, issue d'un épissage alternatif C-terminal de TR β 1 et caractérisée par Tagami *et al.* (2010), pourrait également jouer le rôle de dominant négatif.

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, il semble qu'une seule isoforme de TR α et TR β joue un rôle de RN typique. Les autres isoformes ne seraient que des régulateurs des isoformes actives. Toutefois, très tôt les travaux sur les isoformes de

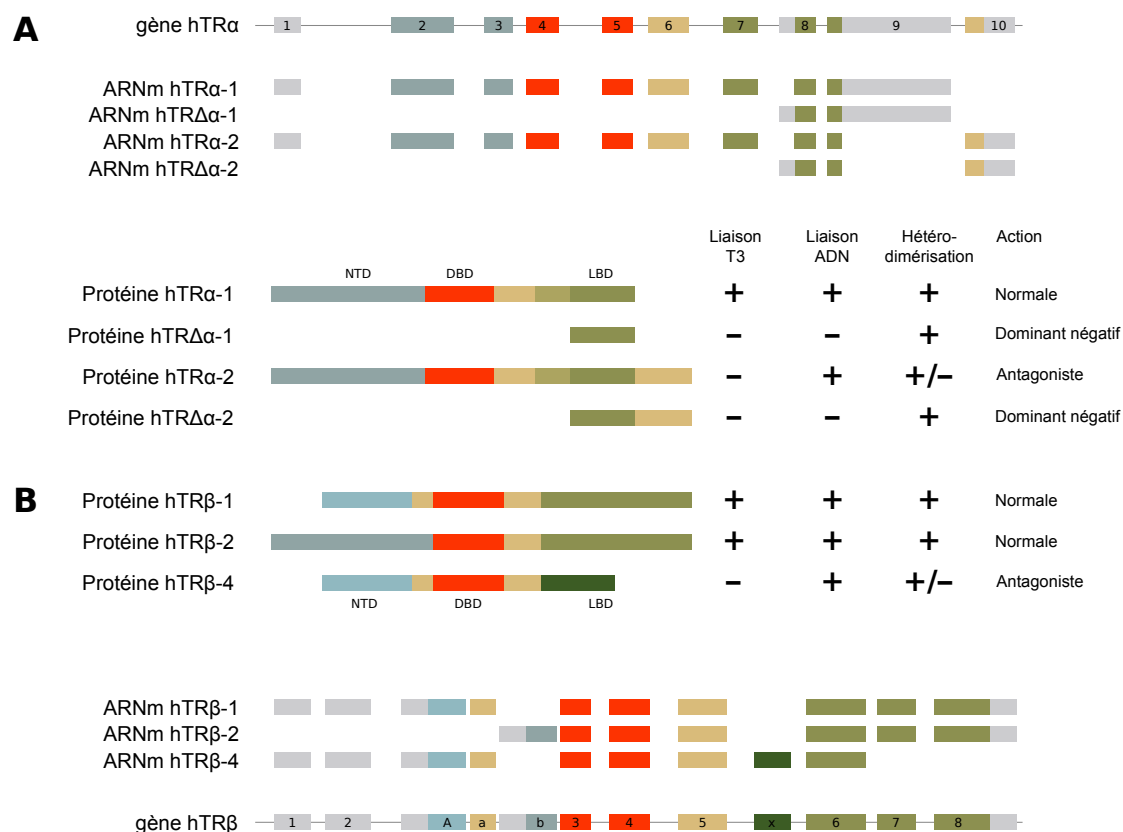


FIGURE 1.6 – Les TRs sont codés par deux gènes, TRα et TRβ. TRα peut générer quatre isoformes : TRα-1 est la seule forme possédant un LBD fonctionnel. TRΔα-1 et -2 ainsi que TRα-2 jouent le rôle d’antagonistes ou de dominants négatifs. Les deux isoformes de TRβs sont fonctionnelles mais ont des profils d’expression tissus spécifiques. Seules les formes identifiées chez l’humain sont représentées ici. NTD : N-terminal domain ; DBD : DNA binding domain ; LBD : ligand binding domain. Figure inspirée de Jones *et al.* (2003); Flamant et Samarut (2003); González-Sancho *et al.* (2003); Bassett et Williams (2009); Tagami *et al.* (2010).

TR ont pointé du doigt le caractère tissu- et stade- spécifique de chacune d’entre elles (pour revue, Flamant et Samarut, 2003; Cheng *et al.*, 2010). L’étude comparée du rôle des HTs chez différentes espèces a permis de mettre en évidence une dynamique conservée du rôle des différents TRs au cours du développement. La première isoforme exprimée chez le zygote semble être TRα2, suivie de TRα1 au moment de la maturation de la glande thyroïde (Strait *et al.*, 1991). De part son expression précoce, TRα1 est l’isoforme la plus importante au début du développement. Les isoformes tronquées de TRα resteront exprimées très localement chez l’adulte, notamment dans le cerveau. L’expression de TRβ est en général concomitante avec un pic d’HTs circulantes à la naissance (Keijzer *et al.*, 2007). Chez l’adulte, tandis que TRβ1 est exprimé dans de nombreux tissus et principalement le foie, TRβ2

reste exprimé essentiellement dans l'hypothalamus et l'hypophyse, contribuant à la régulation de l'axe HPT (Schwartz *et al.*, 1994) et dans la rétine (Abel *et al.*, 1999). La tissu-spécificité de chaque isoforme et la précocité de leur expression durant le développement sont présentées dans le Tableau 1.2.

Tissu	TR α				TR β		
	TR α 1	TR α 2	TR $\Delta\alpha$ 1	TR $\Delta\alpha$ 2	TR β 1	TR β 2	TR β 4
Rein	+	+			++		
Foie	-	-			++		
Cerveau	++	++	++		++	++	+
Coeur	+	+			++	+	+
Thyroïde					++		
Muscle squelettique	+	+			+		+
Poumons	+	+			+	+	
Rate					+		+
Testicules	-	-					++
Rétine						++	
Oreille interne						+	
Os (ostéoblastes)	++	++				++	
Os (chondrocytes hypertrophiés)	++	++			++	-	
Neurones hypothalamiques	+	+				++	
Anté-hypophyse						++	++
Épithélium intestinal			+	+			
Précocité durant le développement	+	+	++	+			

TABLE 1.2 – Tissu-spécificité des différentes isoformes des TRs. Données intégrant des données humaines et murines. Tiré de Cheng *et al.* (2010); Jones *et al.* (2007); Abu *et al.* (2000); Williams (2000). (-) : Très faiblement exprimé ; (+) : Exprimé ; (++) : Fortement exprimé.

1.3.5 Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes

Aussi bien en absence qu'en présence de ligand, TR peut se fixer à l'ADN via son DBD (voir sous-section 1.3.2) au niveau de TREs (éléments de réponse aux HTs).

Cette composante de l'action des HTs fut montrée pour la première fois par Wight *et al.* (1987). La séquence canonique d'un demi-site a pour séquence 5'AGGTCA3' (Figure 1.7 A). Cette séquence peut cependant être dégénérée (Figure 1.7 B), sans que cela ne soit une indication sur la spécificité de la liaison par TR (Chatonnet *et al.*, 2013). Cette dernière est plutôt dépendante de l'orientation et de l'espacement des deux demi-sites. Un TRE standard est constitué de deux demi-site en tandem séparés par 4 pb (Figure 1.7 A) et est lié préférentiellement par l'hétérodimère TR/RXR α (Wahlström *et al.*, 1992). D'autres configurations de la séquence consensus ont été rapportées comme capables de lier TR, en particulier en ER6 (palindrome inversé séparé par 6 pb, "everted repeat separated by 6 bp") et en IR0 (palindrome séparé par 0 pb, "inverted repeat separated by 0 bp") (Figure 1.7 C). Une étude récente visant à lier la régulation de l'expression de gènes cibles par la T₃ avec les propriétés de liaison de TR à l'ADN a mis en évidence un nouveau TRE à proximité de gènes réprimés de façon T₃-dépendante. Cet élément de réponse est un DR0 (répétition en tandem séparée par 0 pb, "direct repeat separated by 0 bp") (Ramadoss *et al.*, 2014)

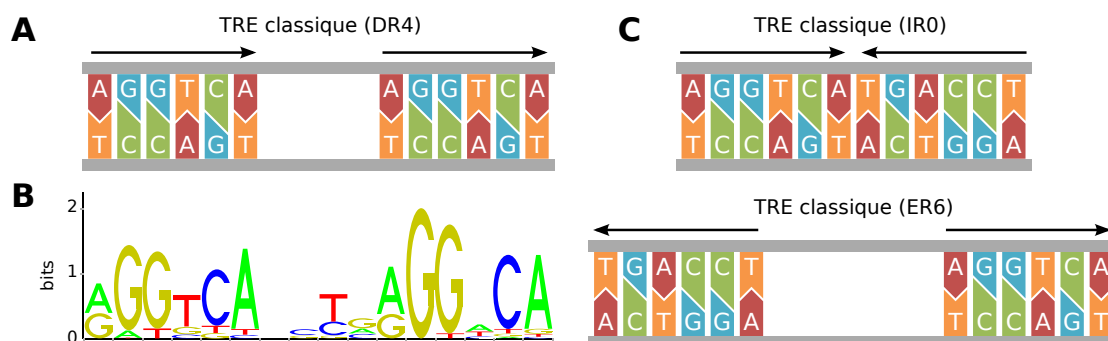


FIGURE 1.7 – Éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes. A) TRE classique organisé en répétition directe séparée par 4 pb. B) Représentation en séquence logo, mettant en avant la variabilité et la dégénérescence partielle du motif. Tiré de Chatonnet *et al.* (2013). C) D'autres TREs rapportés dans la littérature.

En outre, les nucléotides environnant le TRE semblent pouvoir affecter l'efficacité de liaison du récepteur. Ceci suggère une composante structurale des TREs et des éléments de réponse en général au moins aussi importante que leur séquence. Dans ce contexte, les TREs jouent le rôle d'effecteurs allostériques, une propriété commune aux RN (Hall *et al.*, 2002; Billas et Moras, 2013).

1.3.6 Mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

1.3.6.1 Mécanisme classique : La double fonction des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Afin de réguler l'expression de gènes cibles, l'hétérodimère TR/RXR recrute des cofacteurs. Les HTs ne sont en réalité que le signal "interrupteur" permettant aux TRs de basculer d'un rôle répresseur à un rôle activateur. En effet, en absence de ligand, TR se fixe au niveau des TREs et recrute des complexes corépresseurs incluant NCoR (Corépresseur des récepteurs nucléaires, "nuclear receptors corepressor") ou encore SMRT (médiateur d'extinction de RAR et TR, "silencing mediator for RAR and TR"), protéines recrutant à leur tour des HDACs (histone déacétylases) (Wong *et al.*, 1998b). La désacétylation des histones contribue à offrir à la chromatine une conformation non-permissive à la transcription. Lorsque TR est activé suite à la liaison du ligand, un changement conformationnel au niveau du domaine AF-2 entraîne en particulier le relargage des complexes corépresseurs et le recrutement de complexes coactivateurs, dont des HAT (histone acétyltransférase) (Wolffe *et al.*, 1997). L'acétylation des histones déverrouille les nucléosomes, rendant l'ADN accessible à d'autres facteurs de transcription et propice à l'élongation (Wong *et al.*, 1997). En outre, TR activé par le ligand favorise également le recrutement et l'activation de composants de la machinerie transcriptionnelle (Figure 1.8), ainsi que le recrutement de remodeleurs de la chromatine tels que p300 et les complexes SWI/SNF ("SWItch/Sucrose NonFermentable") (Huang *et al.*, 2003; Heimeier *et al.*, 2008). Ces derniers, par le déplacement de nucléosomes, peuvent exposer des éléments *cis*-régulateurs à d'autres facteurs de transcription.

Un modèle particulièrement pertinent pour l'étude des mécanismes d'actions des HTs *via* TR est le modèle amphibien. Le détail mécanistique de l'action de TR sur la chromatine a en effet énormément bénéficié de ce modèle, aussi bien *in vitro* avec l'utilisation d'oocytes de xénopes que *in vivo* avec l'étude du rôle de TR dans le contexte de la métamorphose (pour revue, Grimaldi *et al.*, 2012, paragraphe 2.2; Annexe A- 1).

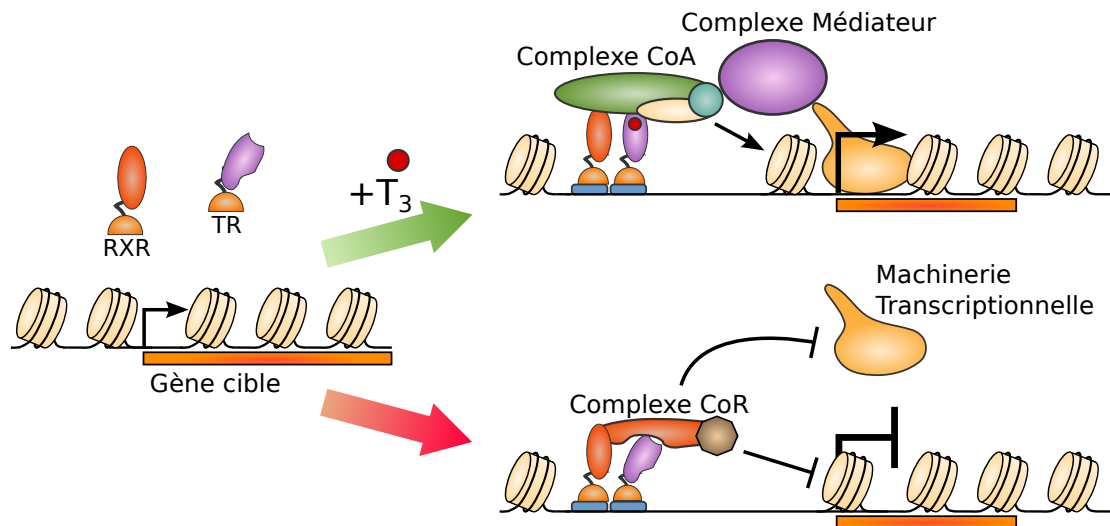


FIGURE 1.8 – Activation de la transcription d’un gène cible des hormones thyroïdiennes. En absence d’HTs et de récepteur, le gène cible est transcrit de façon basale. En absence de ligand uniquement, TR forme un hétérodimère avec RXR et se fixe au niveau d’un TRE au voisinage du gène cible. TR/RXR recrute alors des complexes corépresseurs (complexe CoR) qui empêchent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et désacétylent les queues d’histones, rendant la chromatine non-permissive à la transcription. En présence de T₃, celle-ci se lie à TR et induit un changement de conformation propice au recrutement de complexes coactivateurs (complexe CoA). Ceux-ci vont pouvoir agir sur la chromatine, notamment en acétylant les queues d’histones et rendant l’environnement chromatinien permissif à la transcription. Les CoA sont également capables de recruter des complexes médiateurs qui vont à leur tour recruter la machinerie transcriptionnelle au niveau du TSS (site d’initiation de la transcription, “transcription start site”) et ainsi induire la transcription du gène cible. Enfin, TR lié à la T₃ peut recruter des complexes de remodelage de la chromatine tels que SWI/SNF afin d’exposer des éléments *cis*-régulateurs à d’autres facteurs de transcription, et à favoriser le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale (non-illustré ici).

1.3.6.2 Répression des gènes cible par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes activés

Certaines études montrent toutefois un rôle répresseur des TRs en présence de ligand (Figure 1.9, pour revue Lazar, 2003; Weitzel, 2008). Un effet physiologique important de la régulation négative par TR en présence de ligand est en effet la répression de l'expression de la TSH et de la TRH (Dupré *et al.*, 2004), critique pour une fonction normale de l'axe HPT. À l'heure actuelle, il est supposé que l'effet répresseur des HT par TR implique l'échange de complexes coactivateurs pour des complexes corépresseurs en présence de ligands. Un tel mécanisme a été décrit en particulier dans le contexte de la régulation HT-dépendante de la TSH (Figure 1.9 *a*; Sasaki *et al.*, 1999). Les autres modèles invoquent soit la liaison indirecte du couple TR/RXR à l'ADN, soit l'absence totale de liaison à l'ADN. Dans le premier cas, TR/RXR interagit avec des facteurs de transcription liés à l'ADN (potentiellement cJun/cFos) et inhibe leur effet transactivateur par le recrutement de corépresseurs en présence d'HTs (Figure 1.9 *b,c*; Matsushita *et al.*, 2007). Dans le second cas, TR/RXR séquestre et empêche le recrutement de coactivateurs par d'autres facteurs de transcription (Figure 1.9 *d*; Wulf *et al.*, 2008). Il est à noter qu'une étude récente a mis pour la première fois en évidence un DR0 qui semble caractéristique d'un nTRE (élément négatif de réponse aux HTs) (Ramadoss *et al.*, 2014).

1.3.7 Autres effets des hormones thyroïdiennes

1.3.7.1 Effets non-génomiques des hormones thyroïdiennes

Les effets non-génomiques correspondent à des effets cellulaires ou physiologiques contrôlés par les HTs indépendamment de leurs récepteurs ou de la localisation nucléaire de ces derniers. Les effets sont en général très rapides (de l'ordre de quelques minutes) et ne nécessitent pas de synthèse protéique. La T_3 n'est pas la seule espèce moléculaire à participer à ces effets, la T_4 étant parfois même plus active. Certaines études montrent également des effets des métabolites considérés inactifs dans le contexte des effets génomiques tels que la rT_3 (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1990) et la $3,3'-T_2$ (Lombardi *et al.*, 1998).

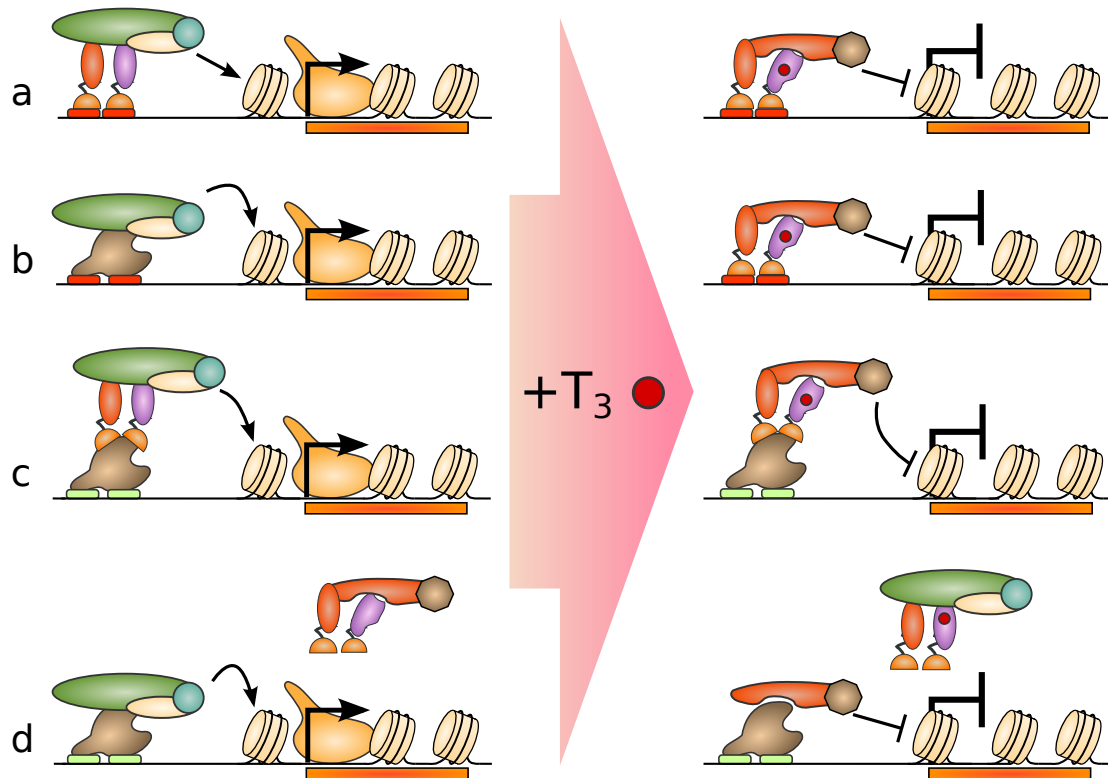


FIGURE 1.9 – Mécanismes de répression par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes activés. a) Recrutement de complexes coactivateurs par RXR/TR liés à un nTRE en absence de ligand. En présence de ligand, des complexes corepresseurs sont recrutés et répriment l'expression du gène. b) En absence de ligand, l'induction du gène est assurée par un autre facteur de transcription se fixant à l'ADN au niveau d'un nTRE. En présence de ligand, RXR/TR se fixe au nTRE et réprime l'expression du gène. c) Même cas de figure que a), mais RXR/TR ne se fixe pas directement à l'ADN, un autre facteur de transcription faisant office d'interface. d) En absence de ligand, RXR/TR non-lié à l'ADN séquestre des complexes corépresseurs tandis qu'un autre facteur de transcription active l'expression du gène cible. En présence de ligand, RXR/TR séquestre les complexes coactivateurs, et le facteur de transcription recrute les complexes corépresseurs précédemment non-disponibles, résultant en la répression du gène cible.

Dans le contexte des effets non-génomiques, les HTs agissent *via* des récepteurs membranaires, les $\alpha_V\beta_3$ s (intégrines $\alpha_V\beta_3$), sur lesquels se fixe la T_4 avec une grande affinité et/ou *via* des TRs cytoplasmiques (Bergh *et al.*, 2005 et pour revue Davis *et al.*, 2008). Un des mécanismes d'action suggéré fait intervenir la dé-répression de TR β par phosphorylation dépendante des formes 1 et 2 de ERK (kinase régulée par des signaux extra-cellulaires, “extracellular-signal regulated kinase”) (Davis *et al.*, 2000) suite à la liaison de la T_4 au récepteur membranaire. La voie $\alpha_V\beta_3$ pourrait ainsi participer à la modulation de l'activité transcriptionnelle de TR indépendamment du ligand classique T_3 , suggérant des communications croisées entre voies génomiques et non-génomiques.

De plus, TR β 1 cytoplasmique est capable de participer à l'effet de la T_3 sur l'augmentation de l'insertion et l'activité de pompes Na/K (potassium)-ATPases. Les récepteurs $\alpha_V\beta_3$ sont nécessaires aux actions des HTs sur le trafic intracellulaire de protéines dont TR (Davis *et al.*, 2005), l'activité de pompes ioniques membranaires (notamment l'antiport Na/protéine) et la régulation calcique. Ces effets se traduisent notamment par une modulation de la contractilité du muscle cardiaque (Davis et Davis, 2002).

L'utilisation de TETRAC (acide tetraidothyroacétique), un antagoniste de la T_4 spécifique de l' $\alpha_V\beta_3$, bloque l'effet angiogénique et proliférateur des HTs, suggérant l'implication de ce récepteur membranaire dans ces processus (Davis *et al.*, 2011).

Enfin, la T_4 et la r T_3 (mais pas la T_3) agissent sur TR $\Delta\alpha$ 1, induisant la conversion d'actine soluble en actine fibreuse. Cet effet est crucial pour la mobilité cellulaire, en particulier des neurones et des cellules gliales dans le cervelet (Safran *et al.*, 1993; Leonard et Farwell, 2006).

La composante non-génomique de l'action des HTs, un phénomène découvert il y a plus de 50 ans et qui a été, jusqu'à il y a peu, controversé, est aujourd'hui de plus en plus considéré. L'intégration de ces phénomènes peuvent apporter de nouveaux mécanismes d'action et ainsi expliquer une partie des effets pléiotropes des HTs (Brix *et al.*, 2011).

1.3.7.2 Effets mitochondriaux

Enfin, il a été montré que les HTs pouvaient avoir une action directe sur l'expression de gènes mitochondriaux et sur la phosphorylation oxydative (pour revue Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001). Les mitochondries disposent de leur propre génome codant pour un nombre variable de gènes selon les espèces. Cependant, la majorité des protéines mitochondriales sont produites à partir de gènes nucléaires puis importées dans la mitochondrie (pour revue Schaffer et Suleiman, 2007). Les HTs sont capables d'agir sur la transcription de gènes à ces deux niveaux en augmentant la synthèse d'ARNm (ARN messenger) mitochondriaux dans le foie (Enríquez *et al.*, 1999), mais une action au niveau du noyau permet également une synthèse augmentée de facteurs de transcription mitochondriaux (Garstka *et al.*, 1994). En outre, deux formes tronquées dérivées de TR α (p43 et p28) capables de lier la T₃, sont synthétisées à partir de l'ADN génomique puis transportées dans la mitochondrie où elles agissent comme facteurs de transcription (Wrutniak *et al.*, 1995). Des travaux récents utilisant des souris transgéniques portant une forme de p43 invalidée suggèrent un rôle de ces récepteurs dans le métabolisme glucidique et la sensibilité à l'insuline (Bertrand *et al.*, 2013). De manière générale, l'action des HTs sur le métabolisme mitochondrial va essentiellement contribuer à moduler les processus apoptotiques et à favoriser la phosphorylation oxydative (pour revue Psarra et Sekeris, 2008). En interagissant avec PGC-1 α (coactivateur de PPAR γ , "peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator"), elles pourraient également agir sur la biogenèse mitochondriale, en particulier sur les événements de fission/fusion (Ventura-Clapier *et al.*, 2008).

1.3.8 Effets sur le transcriptome

Les HT agissant principalement sur la transcription de gènes cibles, des efforts ont été entrepris dès les années 1990 pour caractériser le transcriptome affecté par cette hormone. Les paragraphes suivants présentent les effets globaux des HTs sur le transcriptome de différents tissus ou organes sélectionnés chez une variété d'espèces.

Dans l'hippocampe et le cortex de souris, Chatonnet *et al.* (2011) ont étudié

les effets d'une déficience graduelle en HT et montrent un effet dose dépendant qui affecte un nombre très restreint de gènes. En outre, certains gènes ne semblent affectés que par une déficience modérée en HT. Les effets macroscopiques modérés de l'addition ultérieure d' HTs révèlent sans doute leur action dans la différenciation cellulaire. Une des cibles neuronale des HTs la mieux caractérisée est l'induction dans les neurones de Hairless (Thompson, 1996), un gène cible directe capable de lier TR au niveau de son promoteur.

Dans le foie de poulet, les HTs modulent l'expression de gènes impliqués dans une grande variété de fonctions biologiques comme le métabolisme énergétique, le transport et le stockage d'énergie, la transduction de signaux, le renouvellement des protéines et l'élimination de xénobiotiques (Wang *et al.*, 2007). Chez les rongeurs, les HTs affectent le métabolisme du cholestérol, la sécrétion de bile et des processus impliqués dans l'oncogenèse (Ventura-Holman *et al.*, 2007). En outre, il a été montré que dans ce tissu, la signalisation HT pouvait réguler et interagir avec la signalisation PPAR (Weitzel *et al.*, 2003). Curieusement, les premiers travaux destinés à caractériser le transcriptome du foie en réponse aux HTs par puce à ADN mirent en évidence une part importante de gènes réprimés (près de 75 %) associés à des fonctions biologiques diverses (métabolisme, cycle cellulaire, transduction du signal, immunité, ou encore cytosquelette) (Feng *et al.*, 2000).

Dans le muscle cardiaque du rat, les fonctions principalement affectées sont le métabolisme, la matrice extra-cellulaire et les structures cytosquelettique, la signalisation impliquant les GHs et la signalisation calcique (De *et al.*, 2004). Enfin, des travaux visant à intégrer les données sur les effets au niveau du cœur, des tissu adipeux et du cervelet d'une signalisation thyroïdienne perturbée a permis de mettre en évidence des réseaux de régulation liés à la signalisation thyroïdienne spécifiques de ces tissus (Miller *et al.*, 2004).

Une étude récente sur le foie de souris rapporte un effet de la T_3 sur le métabolisme des lipides et des composés carbohydrates (Ramadoss *et al.*, 2014).

Il ressort que la réponse physiologique générale à ce signal hormonal est difficile à caractériser à cause de sa spécificité tissulaire et de stade de développement. Les ensembles de gènes régulés d'un modèle à l'autre sont en effet peu chevauchants, leur taille pouvant aussi être très variable (d'à peine quelques dizaines de gènes

régulés à plusieurs centaines).

Les Glucocorticoides

2.1 Généralités

Dans les années 1930, E. C. Kendall a mené des travaux critiques dans la compréhension de l'endocrinologie de la glande surrénale. Il isola en effet plusieurs stéroïdes initialement dénommés "composés A, B, E, F", qui se révélèrent plus tard correspondre respectivement à la 11-déhydroxycorticostérone, à la CORT (corticostérone), au cortisol et à la cortisone. Parallèlement, Wintersteiner et Reichstein contribuèrent jusqu'en 1953 à l'isolement de l'aldostérone. D'après les premières expériences fonctionnelles menées sur les corticostéroïdes (hormones stéroïdes produites par la glande corticosurrénale), ils ont été classiquement séparés en deux catégories : les MCs et les GCs (Simpson *et al.*, 1952, 1954). Les MCs font partie intégrante du système rénine-angiotensine et ont été mis en évidence d'après leur capacité à stimuler la réabsorption de Na dans les reins (Gómez-Sánchez *et al.*, 1996). Les GCs, quant à eux, ont été définis initialement par leur capacité à stimuler la gluconéogenèse et leur action sur le métabolisme des carbohydrates (pour revue McMahon *et al.*, 1988). Ils ont cependant une action beaucoup plus générale dans la physiologie et l'homéostasie (Figure 2.1). En particulier, on leur reconnaît actuellement un rôle important au niveau du système cardiovasculaire et respiratoire, du SNC, de la peau, du foie, de la rate et des os. De part leurs effets sur ces différents organes et tissus, il vont pouvoir affecter des processus aussi divers que le métabolisme général, la réponse au stress (Sapolsky *et al.*, 2000), le

système immunitaire et l'inflammation (Busillo et Cidlowski, 2013), ou encore la régulation de processus circadiens (Dickmeis, 2009).

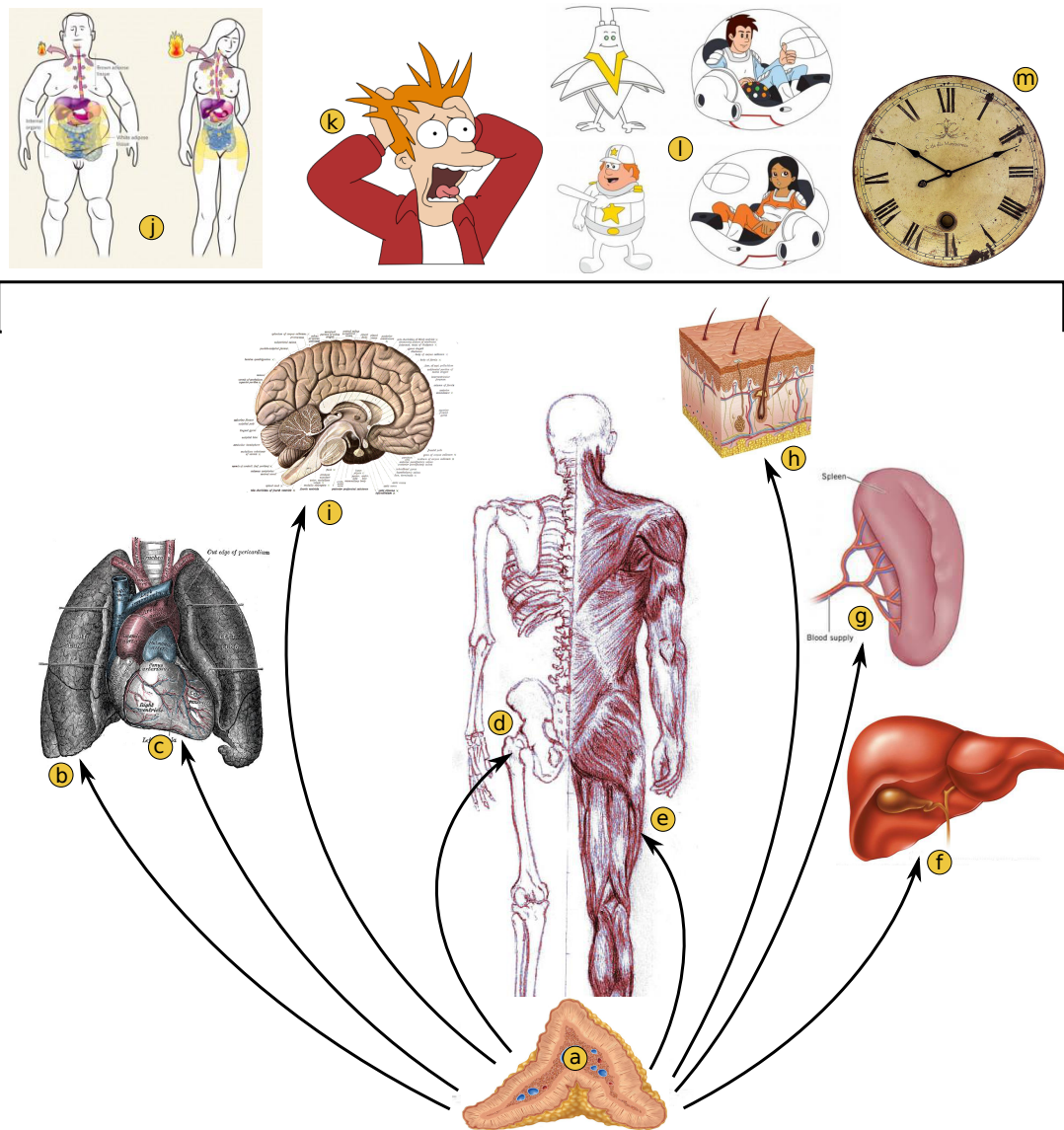


FIGURE 2.1 – Principales fonctions biologiques impliquant les GCs. a. Glande surrénale. b. Poumons. c. Coeur (et système cardiovasculaire). d. Métabolisme squelettique. e. Développement des muscles squelettiques. f. Foie (fonctions hépatiques). g. Rate. h. Peau. i. Système nerveux central (hypothalamus ; hypophyse). j. Métabolisme général. k. Réponse au stress. l. Système immunitaire et inflammation. m. Cycles circadiens.

Au début des années 1970, plusieurs travaux ont convergé vers l'idée que les GCs étaient liés dans le cytoplasme par des récepteurs spécifiques (Baxter et Tomkins, 1971; Rousseau *et al.*, 1972) et que leur action était médiée par la liaison à l'ADN pour réguler l'expression de gènes cibles (Baxter *et al.*, 1972; Payvar *et al.*, 1981). L'action des GRs médiée par la fixation au niveau de séquences régulatrices

spécifiques fut démontrée par Chandler *et al.* (1983); Karin *et al.* (1984); Slater *et al.* (1985). Le GR a été initialement cloné par Weinberger *et al.* (1985), tandis que le MRs (récepteurs aux MCs) humain a été cloné par Arriza *et al.* (1987). Cependant, les deux catégories de corticostéroïdes ne sont pas restreintes à l'interaction avec leurs récepteurs respectifs et les GCs peuvent avoir une activité MC conséquente (Funder *et al.*, 1973; Reul *et al.*, 1990).

2.1.1 Les glandes surrénales

Les corticostéroïdes sont synthétisés par les glandes corticosurrénales. Les surrénales sont des glandes asymétriques positionnées au dessus des reins (Figure 2.2 A). La circulation sanguine dans les surrénales est centripète. Chaque couche est donc exposée à des concentrations croissantes en corticostéroïdes, ce qui est essentiel en particulier dans la *medulla* qui nécessite des concentrations élevées de GC afin de stimuler une des enzymes requises dans la synthèse d'adrénaline (Nussey et Whitehead, 2001). Ces glandes sont composées de deux organes : la médullosurrénale et la corticosurrénale.

2.1.1.1 La corticosurrénale

Dérivée du mésoderme (Hammer *et al.*, 2005), elle est responsable de la production d'hormones stéroïdes non-sexuelles (essentiellement GCs, MCs et androstérone). La corticosurrénale est composée de trois couches illustrées schématiquement Figure 2.2 B (Charlton, 1990; Parker *et al.*, 1993) :

- La *zona glomerulosa*, la couche la plus externe, positionnée juste sous la capsule. C'est dans cette région qu'est synthétisée l'aldostérone dans le contexte du système rénine-angiotensine (Figure 2.2 C). Les MCs sont en effet par ce biais, responsables du contrôle de la pression osmotique des fluides extracellulaires (Feraco *et al.*, 2013).
- La *zona fasciculata*, dont les cellules sont organisées en fascicules. Les GCs sont produits dans cette région sous forme de cortisol (Figure 2.2 C) chez l'humain. Cette région produit également une partie des précurseurs de stéroïdes androgènes sous forme de DHEA (dehydroépiandrostérone). Cette dernière est convertie localement en DHEA-sulfate. Ces précurseurs sont

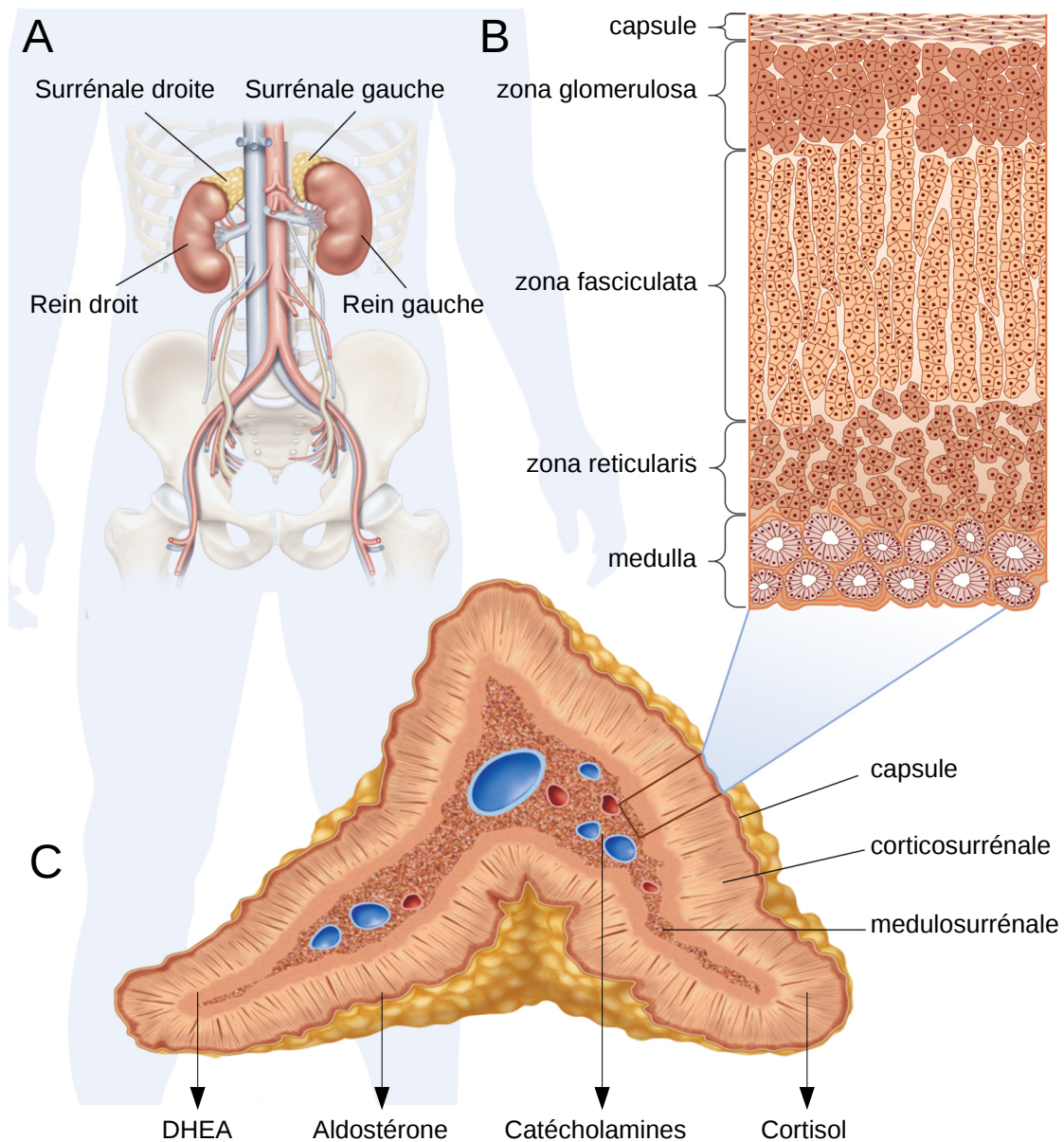


FIGURE 2.2 – Schéma des glandes surrénales. Les glandes surrénales sont deux glandes situées au dessus des reins. Elles sont entourées de la capsule, qui maintient leur structure. La *medulla* est la partie centrale des surrénales et compose les médullosurrénales. C’est dans cette structure que les cellules chromaffines (en bleu) produisent les catécholamines sous forme d’adrénaline et de noradrénaline. Le cortex compose les glandes corticosurrénales. Il est subdivisé en trois couches, la *zona glomerulosa* où sont produits les MCs, la *zona fasciculata* produisant essentiellement les GCs et la *zona reticularis* produisant essentiellement des hormones androgènes et une partie des GCs. Peu de stockage a lieu, et les hormones synthétisées sont immédiatement libérées dans la circulation sanguine. Figure adaptée de Encyclopaedia Britannica.

directement libérés dans la circulation afin d'être convertis en stéroïdes sexuels dans les gonades.

- La *zona reticularis* est la couche la plus interne de la corticosurrénale. Elle est composée de cellules dont la configuration générale rappelle celle d'un réseau. Une partie des GCs sont synthétisés ici, ainsi qu'une partie de la DHEA et DHEA-sulfate (Figure 2.2 C). Pour revue voir (McKay et Cidlowski, 2003a)

2.1.1.2 La médullosurrénale

Composée de la *medulla*, elle est dérivée du neuroectoderme et fait partie intégrante du SNS. Elle est le lieu de production de catécholamines sous forme de 80 % d'adrénaline et 20 % de noradrénaline. Celles-ci sont produites spécifiquement par les cellules chromaffines (tirant leur nom de leur coloration par des sels de chrome). Les catécholamines sont dérivées de la tyrosine et sont les hormones principalement responsables de la réaction immédiate de lutte ou de fuite ("fight or flight response"), c'est à dire la réponse physiologique stéréotypée (mobilisation des réserves glucidiques, stimulation de la fonction cardiaque, dilatation des bronches et des vaisseaux sanguins ...) vers un effort physique intense dans le but de fuir ou d'affronter un danger imminent.

2.2 Métabolisme et transport des glucocorticoïdes

2.2.1 Synthèse des glucocorticoïdes

2.2.1.1 Stéroïdogenèse et biosynthèse des GC

Toutes les hormones stéroïdes sont des dérivés du cholestérol, un stérol (molécule organique) identifié pour la première fois par François Poulletier de la Salle en 1769. C'est un composé présent chez les métazoaires permettant de réguler physiquement la perméabilité et la fluidité des membranes cellulaires en fonction de la température (Cooper, 1978). Le cholestérol est produit *de novo* par toutes les cellules, en particulier dans le foie, les intestins, les gonades et les surrénales, mais peut être

obtenu par l'alimentation.

La biosynthèse des GCs fait intervenir plusieurs enzymes qui modifient une molécule de cholestérol ou de dérivé du cholestérol. Les GCs, sous forme de cortisol ou CORT, sont obtenus en étapes successives détaillées dans la Figure 2.3. La chaîne latérale du cholestérol est d'abord clivée par la P450scc (enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol) (Chung *et al.*, 1986), pour obtenir de la pregnénolone. Celle-ci peut être convertie en 17α -OH-pregnénolone (17α -hydroxypregnénolone), 17α -OH-progestérone (17α -hydroxyprogestérone) ou en progestérone par le biais de la *gl3bhsd* et de la 17α -OHase (17α -hydroxylase). La 17α -OH-progestérone et la progestérone sont ensuite hydroxylées successivement par la 21-OHases (21 -hydroxylases), formant ainsi le 11 -déoxycortisol et la DOC (déoxycorticostérone), et la 11β -OHase (11β -hydroxylase) pour donner le cortisol et la CORT. L'aldostérone peut être formée à partir de cette dernière par la 18β -OHase (18β -hydroxylase). Pour revue, voir (Ghayee et Auchus, 2007)

2.2.1.2 Axe hypothalamo-hypophyso-adrénal

La sécrétion de cortisol est contrôlée par l'axe HPA (hypothalamo-hypophyso-adrénal) faisant intervenir le SNC et la corticosurrénale (Figure 2.4; Herman et Cullinan, 1997). La production de GCs suit un rythme circadien imposé en partie par l'axe HPA, avec chez les mammifères diurnes un pic de GCs circulants au réveil (Dickmeis, 2009 pour revue). Cette production de GCs active des neurones corticotrophes dans l'anté-hypophyse et stimule la libération d'ACTH (adrénocorticotrophine) dans la circulation sanguine. L'ACTH agit ensuite sur la corticosurrénale pour induire la production de cortisol. Enfin, le cortisol (la CORT chez les rongeurs, les sauropsides et les amphibiens) agit sur l'hypothalamus et l'anté-hypophyse pour exercer un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRH (corticolibérine) et d'ACTH. Parallèlement, le cortisol et les autres hormones stéroïdes agissent sur leurs tissus cibles pour médier la réponse à un stress (Herman et Cullinan, 1997; Tsigos et Chrousos, 2002).

Une production accrue de GCs peut également avoir pour origine un stress : Un stress induit la production de CRH par l'hypothalamus, stimulant la production de GCs *via* cet axe.

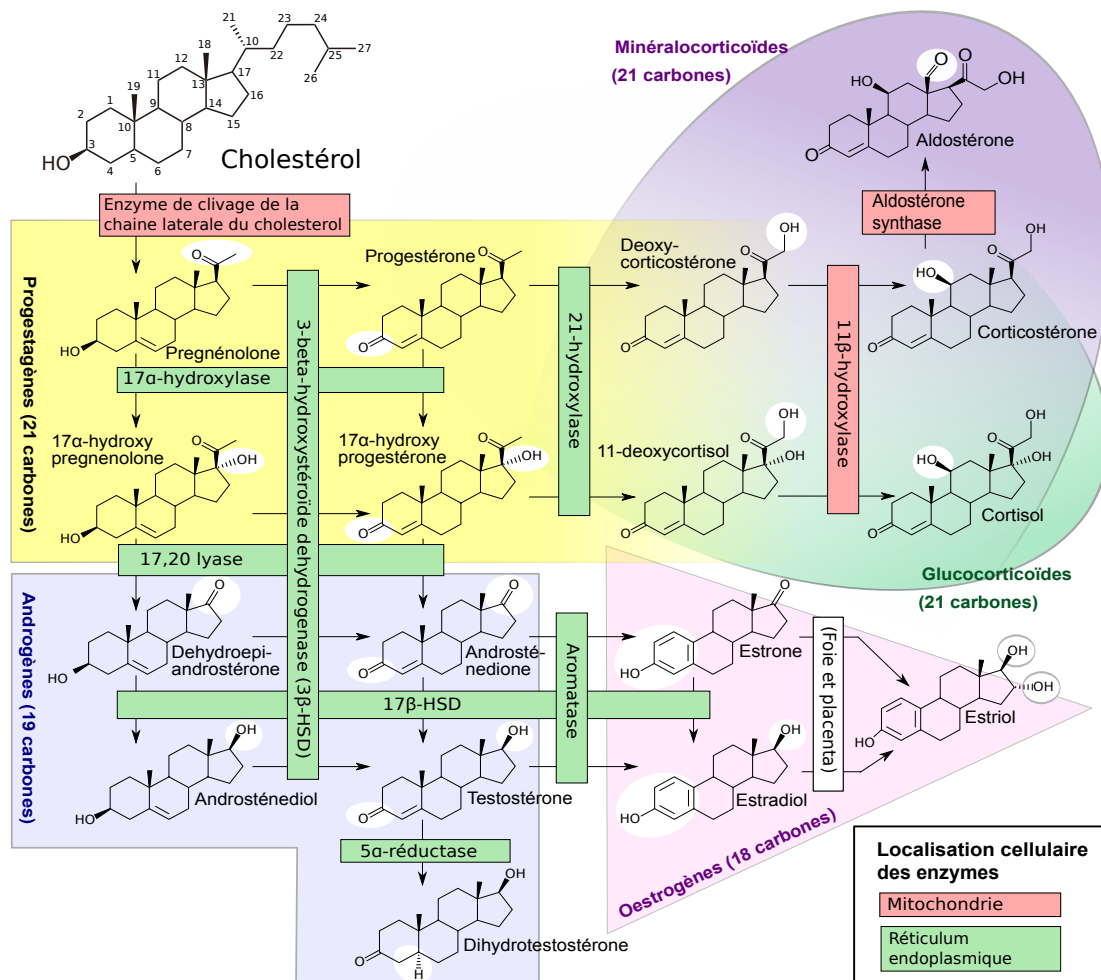


FIGURE 2.3 – Principales étapes de la stéroïdogenèse. Le cholestérol est tout d'abord convertit en pregnénolone, qui à son tour est convertie en 17 α -OH-pregnenolone, en 17 α -OH-progestérone ou en progestérone. Ces deux dernières servent de précurseurs directs à l'obtention de 11-déoxycortisol et de DOC (déoxycorticostérone). Enfin, par hydroxylation du 11-déoxycortisol et de la DOC, le cortisol et la CORT (corticostérone) sont obtenus. Les stéroïdes sexuels sont synthétisés à partir de 17 α -OH-pregnenolone et de 17 α -OH-progestérone (partie inférieure du diagramme). Tiré de "Steroidogenesis.svg" par David Richfield et Mikael Häggström.

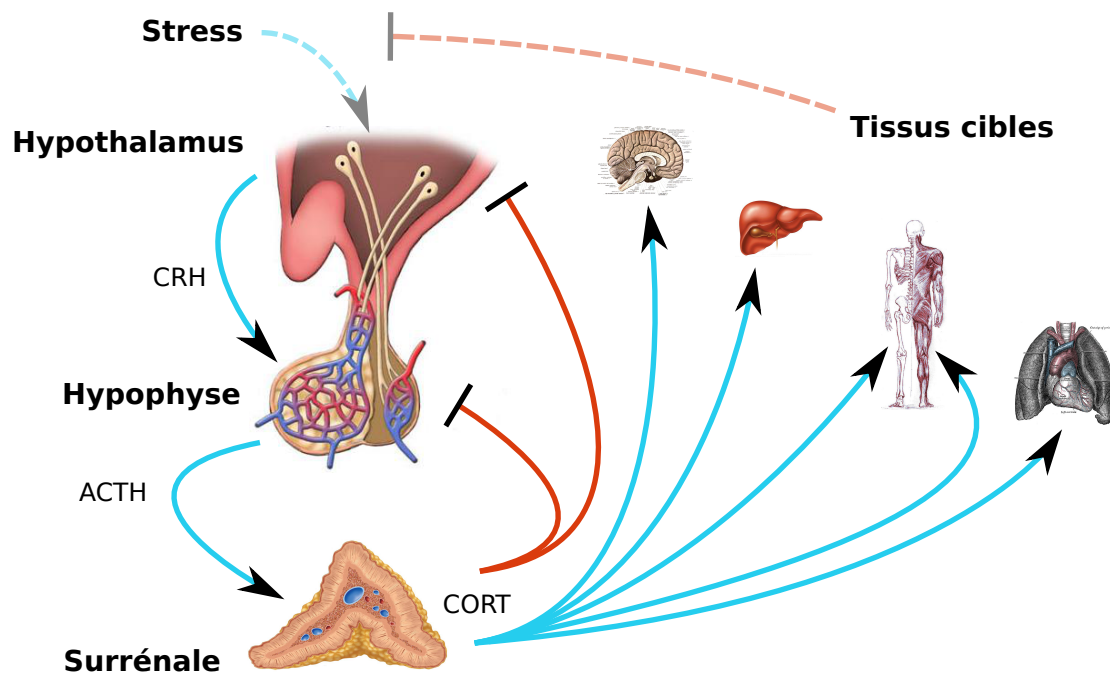


FIGURE 2.4 – L’axe HPA implique l’hypothalamus, l’anté-hypophyse et les glandes corticosurrénales. L’hypothalamus secrète la CRH, qui à son tour stimule la production d’ACTH par l’hypophyse. L’ACTH libérée dans la circulation sanguine va pouvoir agir sur la glande corticosurrénale pour initier la synthèse de corticostéroïdes (quasiment aucun stockage n’a lieu). Ceux-ci vont enfin agir d’une part sur les tissus cibles pour maintenir la physiologie de base, et d’autre part sur l’hypothalamus pour exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de CRH. Un stress peut également être à l’origine d’une élévation de la concentration en GCs *via* la stimulation de la production de CRH. Dans ce cas, l’action des GCs sur les tissus cibles va induire un maintien de l’homéostasie en contribuant à moduler la réponse au stress.

2.2.2 Transport des glucocorticoïdes

Les corticostéroïdes, comme d'autres hormones stéroïdes, sont couplés à une protéine de transport dans le sang, la CBG (globuline liant les corticostéroïdes, "corticosteroid binding globulin") (Rosner, 1990). C'est une α -globuline produite dans le foie capable de lier les GCs et présentant de fortes similarités de séquence avec les serpins. Une fraction élevée des hormones stéroïdes circulantes est liée à la CBG (Bittar et Bittar, 1997; Becker *et al.*, 2001) :

- Environ 3/4 du cortisol et de la cortisone circulants
- la majeure partie de la CORT et de la DOC.
- Environ 1/6 de l'aldostérone. La moitié est liée à l'albumine et le reste est sous forme libre.
- Une fraction minoritaire de la progestérone (environ 1/6)

2.2.3 Métabolisme local des glucocorticoïdes

De même que pour les HTs, les GCs sont métabolisés en formes plus ou moins actives au niveau des tissus cibles, offrant ainsi un mécanisme de régulation supplémentaire de leur action systémique. Les enzymes clés du métabolisme local des GCs sont la 11- β -HSD1 (11- β -hydroxystéroïde déhydrogénase/ Δ -5-4 isomérase, type 1) et la 11- β -HSD2, qui assurent l'inter-conversion (observée dès les années 1950) de GCs actifs (cortisol ou CORT) et de formes inertes (cortisone ou 11-déhydrocorticostérone). Ça n'est que dans les années 1980 que leur importance physiologique fut prise en compte (Edwards *et al.*, 1988; Funder *et al.*, 1988) et permit de résoudre le paradoxe des interactions croisées entre MCs et GCs. En effet, la présence de la 11- β -HSD2 dans les tissus cibles des MCs inactive rapidement les GCs permettant l'accès sélectif de l'aldostérone aux MRs (Figure 2.5, voir pour revue Seckl et Walker, 2001).

De façon intéressante, la 11- β -HSD2 est une déshydrogénase stricte. Au contraire, la 11- β -HSD2 possède principalement une activité réductase, mais peut sous certaines conditions prendre le rôle d'une 11- β -déshydrogénéase et agir ainsi en tant qu'enzyme inactivante des GCs (Phillips *et al.*, 1989).

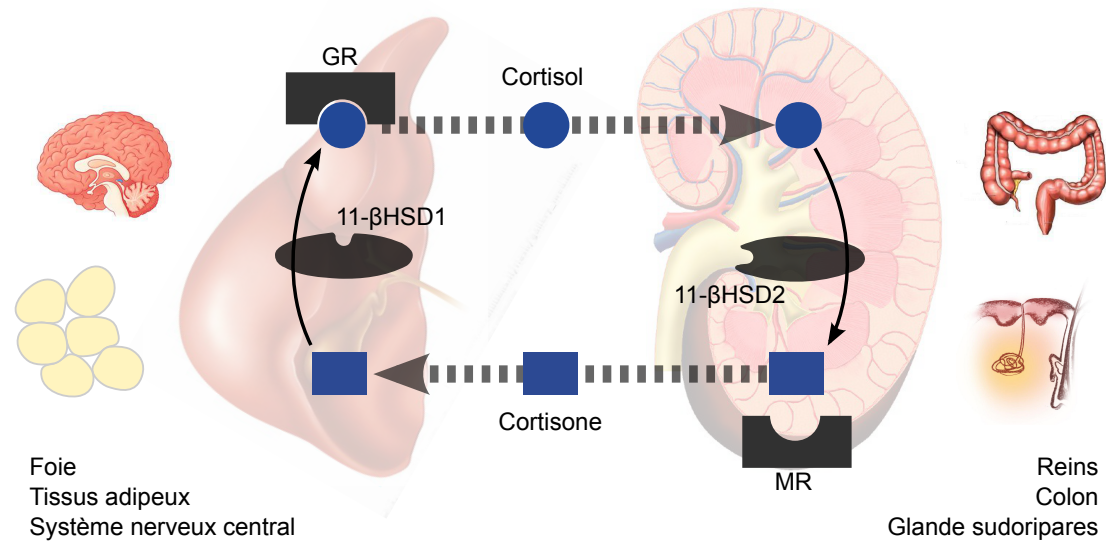


FIGURE 2.5 – La 11- β -HSD2 agit dans les tissus cibles des MCs pour empêcher le cortisol de lier aspécifiquement les MRs. La 11- β -HSD1, quant à elle, agit dans de nombreux tissus pour augmenter la concentration locale en GCs et ainsi maintenir l'exposition des GRs à leurs ligands. Tiré de Seckl et Walker (2001).

2.3 Rôles des glucocorticoïdes

2.3.1 Rôles Développementaux

Les GCs ont de nombreux rôles développementaux et dans l'organogenèse. La signalisation des GCs est en effet impliquée dans la maturation et l'activation fonctionnelle de nombreux organes dont le coeur, les poumons, les intestins, le pancréas et les reins (Majumdar et Nielsen, 1985; Liggins, 1994; Pierce *et al.*, 1995; Gesina *et al.*, 2004). Les GCs de synthèse sont ainsi devenus un outil médical important pour aider le développement des organes chez les nouveaux-nés prématurés, en particulier la maturation des poumons (Becker *et al.*, 2001) en stimulant la production de surfactant (Bolt *et al.*, 2001). Chez la souris, l'inactivation du gène codant pour GR empêche le développement des poumons (Cole *et al.*, 2001). Dans le cadre du développement du système digestif, les GCs régulent la communication cellulaire dans l'intestin grêle (Schaeffer *et al.*, 2000). Les GCs ont enfin de profonds effets sur le développement squelettique en augmentant l'activité des ostéoblastes et des effets délétères sur le développement cérébral en retardant la maturation des neurones et des cellules gliales. De façon intéressante, chez les

mammifères, l'incapacité de certaines structures cérébrales comme l'hippocampe à répondre au signal GC à cause d'une expression ou d'une activité altérée de GR a été associée à certains comportements pathologiques (Liu *et al.*, 1997; McGowan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Ceci suggère que, jusqu'à un certain point, les GCs pourraient participer au modelage du comportement d'un organisme en réponse à un environnement adverse.

Les détails de l'action des GCs dans l'organogenèse et les facteurs de transcription et morphogènes sous le contrôle des GCs sont toutefois encore mal connus.

2.3.2 Actions sur les fluides extra-cellulaires

Bien que l'action des corticostéroïdes sur les fluides extra-cellulaires et leur concentration ionique soit majoritairement assurée par les MCs, les GCs y participent également (McKay et Cidlowski, 2003b). Leurs actions sur les reins diffèrent de celles des MCs par l'absence d'excrétion d'hydrogène. Ils participent toutefois à l'augmentation de la diurèse, de la filtration glomérulaire, ainsi qu'à la rétention de Na et l'excrétion de K. Des pathologies associées à des taux élevés en GCs sont la néphrocalcinose et la néphrolithiase.

2.3.3 Rôles dans le système immunitaire

Dans un contexte médical, les GCs ont vite représenté des cibles thérapeutiques importantes à cause de leurs puissants effets anti-inflammatoires. Toutefois, il est réducteur de ne voir chez les GCs que ce type d'action. Les GCs sont plutôt en réalité un rhéostat cellulaire qui assure une réponse adaptée du système immunitaire. Les GCs affectent ainsi toutes les phases de la réponse immunitaire et en agissant à cinq niveaux (pour revue, voir Busillo et Cidlowski, 2013) : Ils augmentent l'expression de facteurs contrôlant le système immunitaire inné et inhibent l'expression de cytokines pro-inflammatoires en bloquant l'action de facteurs modulant l'aspect acquis du système immunitaire, notamment *via* AP-1 (protéine activante 1, "activating protein 1"), NF- κ B (facteur nucléaire κ B). Enfin, les GCs ont la capacité de promouvoir la résolution de l'inflammation (c'est à dire le retour à un état non-inflammatoire)

et la restauration de l'homéostasie en stimulant la sécrétion de molécules pro-résolutives (comme Annexin-1, favorisant) et en entraînant l'apoptose des cellules T et des neutrophiles (Parrillo et Fauci, 1979). Parallèlement, les GCs induisent un phénotype anti-inflammatoire chez certains macrophages et stimulent la prise en charge des cellules apoptotiques.

Outre leurs effets anti-inflammatoires bien décrits, il semblerait que les GCs puissent également avoir une action pro-inflammatoire en exacerbant la réponse aux lipopolysaccharides (Munhoz *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2012), et agissant en synergie avec la signalisation $\text{TNF}\alpha$ (facteur α de nécrose tumorale, "tumor necrosis factor α ") (Lannan *et al.*, 2012).

2.3.4 Rôles dans l'homéostasie et la réponse au stress

La notion de stress est centrale lorsque l'on mentionne les actions des GCs. On peut même aller plus loin et considérer que leurs effets diversifiés sur le développement, le métabolisme, le comportement, et le système immunitaire constituent plusieurs facettes de la réponse d'un vertébré face à un environnement hostile. Le terme de stress dans un contexte biologique est né notamment grâce à Walter Bradford Cannon et Hans Selye. Le premier caractérisa la réponse de lutte ou de fuite ("fight-or-flight response"; Cannon, 1915) et développa le concept d'homéostasie en 1932 à partir des travaux de Claude Bernard. Le second conceptualisa le stress comme intégrant deux composantes : un ensemble de réponses stéréotypées, le GAS (syndrome d'adaptation générale, "general adaptation syndrome"), et le développement d'un état pathologique découlant d'un stress continu et non-soulagé (Selye, 1946). Ainsi, la réponse de l'organisme est double, et fait intervenir des mécanismes différents visant à faire face au stress à court terme et à long terme.

Dans un premier temps, le SNS est immédiatement impliqué avec la stimulation directe de la médullosurrénale à sécréter des catécholamines responsables du comportement de lutte ou de fuite (Figure 2.6 A).

Dans un second temps (Figure 2.6 B), la médiation de la réponse passe par les GCs et les MCs et vise à modifier la physiologie de façon à résister à un stress prolongé. En particulier, les MCs, via le système rénine-angiotensine, vont

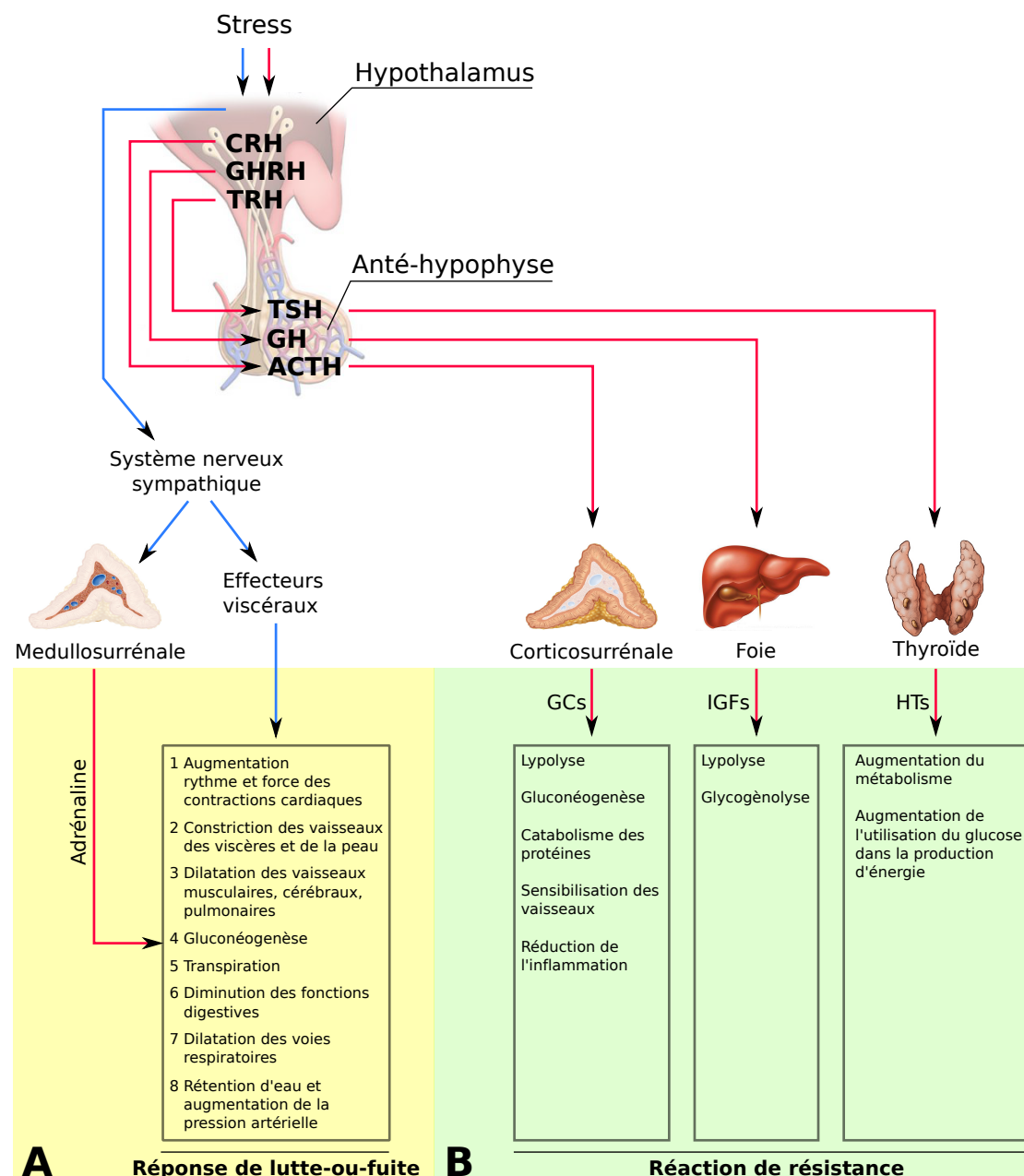


FIGURE 2.6 – Réponses physiologiques à court et à long terme à un stress. Dès les premières minutes, la médullosurrénale est stimulée via le système nerveux sympathique et sécrète des catécholamines responsables de l'augmentation et de l'alimentation de comportement de confrontation ou de fuite (A). À plus long terme (quelques heures à plusieurs jours), les corticostéroïdes provoquent un changement de la physiologie du système circulatoire et excrétoire et participent à l'installation d'un état physiologique correspondant à la réaction de résistance (B). Les GCs induisent la majorité de la réponse au stress en augmentant la mobilisation des ressources énergétiques et en supprimant le système immunitaire. D'autres organes endocrines jouent un rôle, notamment le foie (augmentation de la glycémie sanguine) et la thyroïde (augmentation du catabolisme et de la production d'énergie à partir des stocks mobilisés).

augmenter le volume sanguin et la pression artérielle. Les GCs vont, quant à eux, induire une transition métabolique (pour revue Munck et Náray-Fejes-Tóth, 2010; Weissman, 1990) ayant pour conséquence la consommation des stocks de lipides et protéines (Richard *et al.*, 1993), l'augmentation de la glycémie sanguine par glycogénolyse et gluconéogenèse (Eigler *et al.*, 1979), ou encore la suppression du système immunitaire (voir sous-section 2.3.3). Faire face à un stress prolongé va également inclure la participation d'autres organes endocrines, notamment le foie, qui via les IGFs (facteurs de croissance similaires à l'insuline, "insulin-like growth factors") et PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase), augmente le métabolisme glucidique (Exton, 1987; Weissman, 1990), et la thyroïde, qui via les HTs, augmente le catabolisme du glucose (Weissman, 1990).

Dans une optique plus générale, les GCs peuvent être vus non pas comme l'agent qui suscitera la réponse au stress, mais plutôt comme celui qui modulera la réponse au stress pour éviter un emballement de la réponse physiologique dans un premier temps (action modulatrice, se manifestant au bout d'une à quelques heures), puis qui préparera l'organisme à des stress ultérieurs (action préparatrice, se manifestant au bout de quelques heures et perdurant jusqu'à plusieurs jours) Sapolsky *et al.* (2000).

Les actions modulatrices et préparatrices des GCs peuvent toutes deux se subdiviser en trois catégories :

- Les actions permissives. Exercées par les GCs indépendamment de l'augmentation de leur concentration, elles font partie des actions basales des GCs. Ceci n'exclut cependant pas leur participation lors de la première exposition à un stress.
- Les actions suppressives. Elles visent à réfréner les réactions de défense induites par la réponse au stress, et sont dépendantes d'une augmentation de la quantité de GCs.
- les actions stimulatrices. À l'opposé des actions suppressives, elles visent à augmenter et stimuler la réponse au stress de la première vague de réponse.

Ces actions dépendent également d'une augmentation de la quantité de GCs. Les actions préparatrices peuvent, au même titre que les actions modulatrices, aider ou prévenir la réponse au stress selon les trois modalités listées au paragraphe

précédent. Elles n'affectent cependant pas la réponse immédiate, et préparent l'organisme sur le long terme pour faire face à l'exposition répétée à un stress.

Plusieurs critères ont été établis afin de déterminer à quelle catégorie une action particulière des GCs peut être attribuée. Ils sont basés sur quatre paramètres :

- Le critère de conformité (augmentation ou suppression de l'effet des hormones impliquées dans la première vague de réponse).
- Le critère de temporalité (effet manifesté quelques minutes, heures ou jours après l'exposition au stress).
- Le critère de soustraction ou remplacement d'hormones (réponse au stress en cas d'absence de GCs).
- Le critère d'homéostasie (type d'action faisant le plus sens dans le contexte de la survie de l'organisme).

Dans ce système, on peut donc attribuer aux GCs une action prédominante pour chaque organe, tissu, ou fonction biologique affectée et participant à la réponse au stress (Tableau 2.1).

Action	GCs médiateurs de la réponse au stress		GCs temporisateurs de la réponse au stress	
	Permissive	Stimulatrice	Préparatrice	Suppressive
Effets				
Cardiovasculaires	✓			
Volumes de fluides				✓ *
Système immunitaire	✓			✓ *
Métabolisme	✓	✓	✓	
Transport du glucose et utilisation par le cerveau				✓
Appétit			✓	✓ *
Cognitifs	✓			✓
Comportement et physiologie de la reproduction	✓	✓	✓	

TABLE 2.1 – Types d'effets physiologiques des GCs dans la réponse au stress. Tiré de Sapolsky *et al.* (2000). ✓ * désigne un effet supprimeur aussi bien par les niveaux de GCs basaux que induits par le stress.

2.4 Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

2.4.1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes

Les effets principaux des GC nécessitent la présence dans les cellules cibles de récepteurs spécifiques, les GRs, clonés par (Weinberger *et al.*, 1985). Ces derniers sont des RN de la sous-famille 3 (NR3C1), et agissent comme facteurs de transcription régulant l'expression de gènes cibles. En absence de GC, GR reste cytoplasmique, séquestré par des protéines chaperonnes. La fixation du ligand induit la libération de GR, qui va pouvoir être transloqué dans le noyau et, dans le modèle classique, former des homodimères pour se lier au niveau d'éléments de réponse. Le recrutement ultérieur de complexes co-régulateurs va permettre la modulation de la transcription des gènes cibles (Figure 2.7).

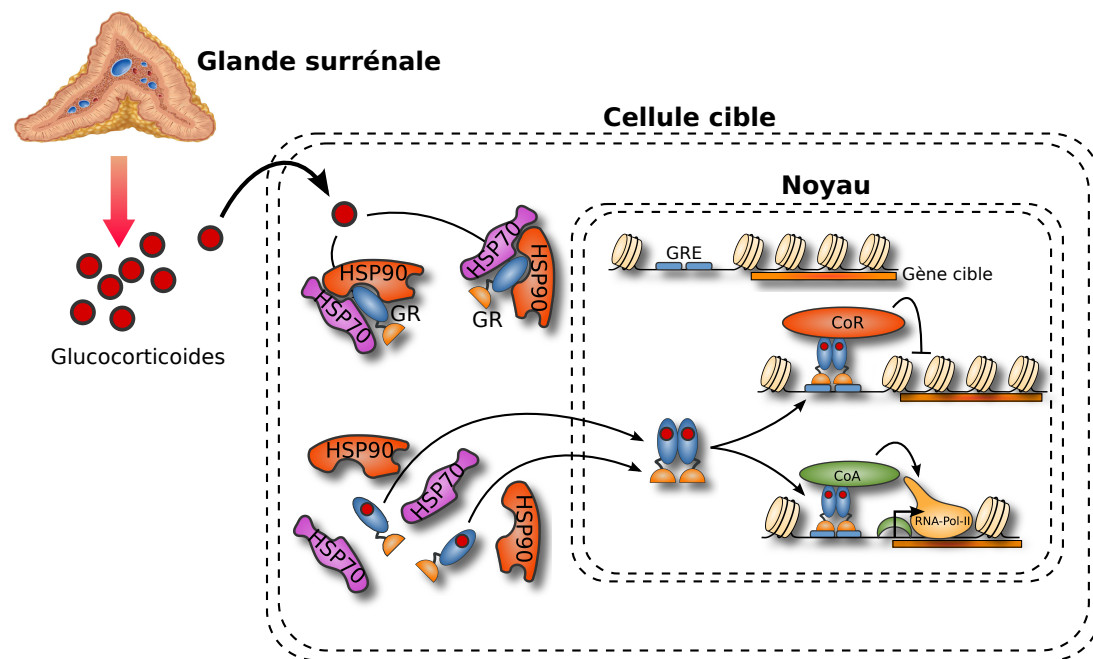


FIGURE 2.7 — Modes d'action généraux des GCs. Les GCs sont produits par la glande corticosurrénale, libérés dans la circulation sanguine et diffusent dans les cellules des tissus cibles. En absence de ligand, GR est séquestré dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes dont HSP90 et HSP70 (protéine de choc thermique de 70 kDa, “heat-shock protein, 70 kDa”). La liaison du ligand sur GR provoque la dissociation des complexes de séquestration et la translocation de GR activé dans le noyau. Il va pouvoir alors se fixer à l’ADN sur des motifs spécifiques correspondant à des éléments de réponse, les GREs (éléments de réponse aux GCs). Les complexes co-régulateurs recrutés vont pouvoir servir de médiateurs de l’activité trans-répressive ou trans-activatrice de GR.

2.4.2 Structure des récepteurs aux glucocorticoïdes

Les GRs sont des RNs, et en tant que tels ont une structure classique composée des domaines LBD, DBD et NTD (domaine N-terminal, “N-terminal domain”) similaires à ceux décrits précédemment dans le cadre des TRs (voir sous-section 1.3.2).

Chez l’humain, le gène codant pour GR peut donner deux isoformes, le GR α (GR, isoforme α), majoritaire, et le GR β (GR, isoforme β), représentant 0.2 à 1 % des GRs totaux (Figure 2.8). Seul GR α , ubiquitaire, possède un LBD fonctionnel, réduisant GR β à un dominant négatif naturel exprimé de façon relativement tissu-spécifique (Lu et Cidlowski, 2004). De façon intéressante, plusieurs pathologies associées à une résistance aux GC, dont RA (arthrite rhumatoïde), sont corrélées avec des niveaux d’expression élevés de GR β . Plusieurs mécanismes sous-tendent cette action dominante-négative de GR β (Voir sous-section 2.4.3).

Des isoformes supplémentaires (GR α /GR β -A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2 et -D3) peuvent être générées par utilisation de sites d’initiation de la traduction alternatifs (“ribosomal shunt” et “ribosome leaky scanning”, Lu et Cidlowski, 2005). De façon intéressante, les isoformes traductionnelles générées à partir de GR α sont toutes fonctionnelles, avec des activités transactivatrices variables (Lu et Cidlowski, 2005). Par exemple, GR α -C3 est deux fois plus active, tandis que GR α -D1, -D2 et -D3 présentent une activité deux fois moindre. Voir pour revue (Lu et Cidlowski, 2006). Ci-dessous sont présentées les spécificités des domaines de GR par rapport aux autres RNs.

Le domaine N-terminal Le NTD représente la portion la plus variable chez les RNs, et ce, malgré son importance fonctionnelle. Elle contient la région AF-1 possédant une forte capacité d’activation de la transcription et pouvant agir indépendamment de la liaison du ligand (Godowski *et al.*, 1987). Elle confère ainsi à GR la capacité d’induire l’expression de gènes cibles en absence d’hormone d’une manière cellule- et co-activateurs- dépendante. En outre le NTD contient les sites principaux de phosphorylation de GR pouvant moduler son activité transactivatrice et sa localisation nucléaire (pour revue, voir Galliher-Beckley et Cidlowski, 2009). Des études *in vitro* ont montré que la conformation particulière de AF-1 pouvait

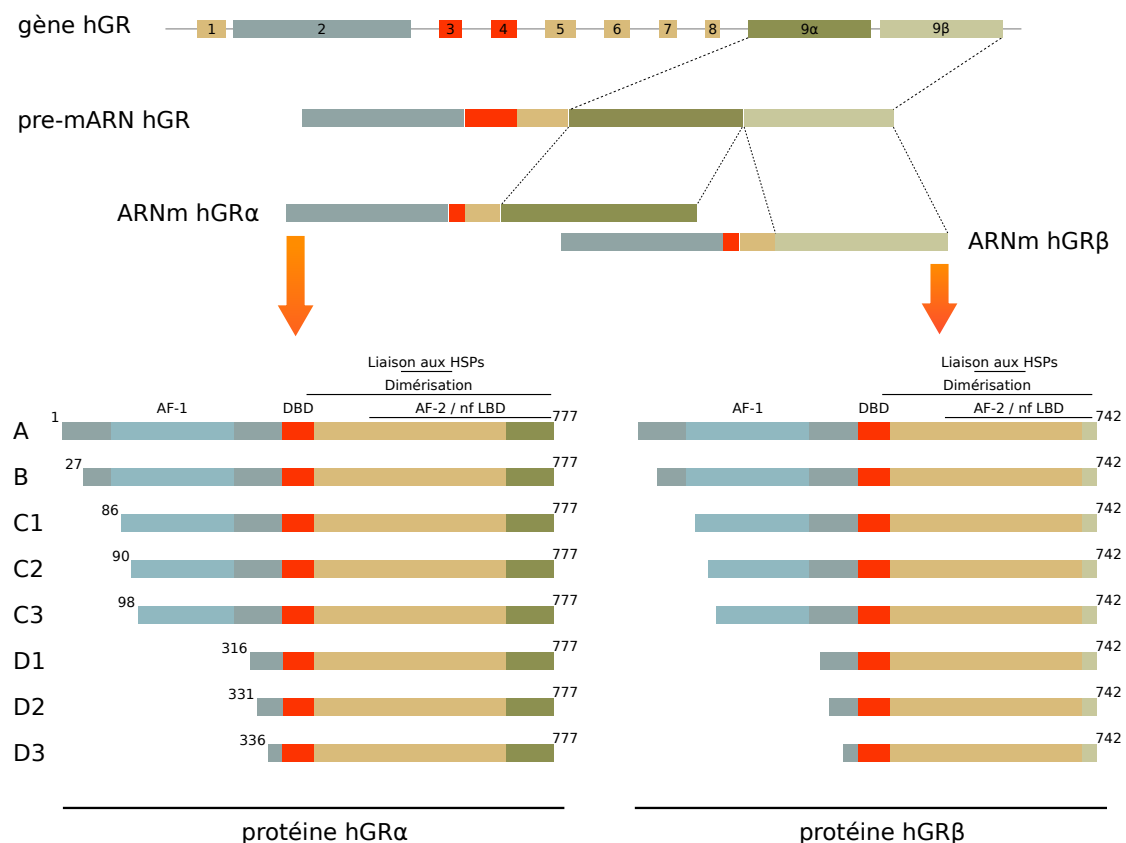


FIGURE 2.8 – Il n'existe qu'un seul gène codant pour GR. Deux isoformes GR α et GR β sont obtenues par épissage alternatif du 9^{ème} exon. Contrairement à GR α , GR β ne possède pas de LBD fonctionnel, et agit en tant que dominant négatif naturel.

permettre la liaison de coactivateurs, notamment TBP (protéine de liaison aux boîtes TATA, "TATA-box binding protein"), CBP (protéine de liaison à CREB, "CREB binding protein") et les SRC (coactivateur des récepteurs aux stéroïdes, "steroid receptor coactivator") (Kumar et Thompson, 2005). Enfin, les isoformes D (ne contenant pas le domaine N-terminal complet), sont constitutivement nucléaires, suggérant que ce domaine est important pour l'export nucléaire ou la compartimentation cytoplasmique de GR (Lu et Cidlowski, 2006).

Le domaine de liaison à l'ADN Le DBD de GR contient deux structures en doigt de zinc très conservées. Trois acides aminés de la "boîte P" situés dans le premier doigt de zinc confère la spécificité de liaison aux GREs (Luisi *et al.*, 1991). Le second doigt de zinc comporte cinq acides aminés dans la "boîte D" jouant un rôle important dans l'homodimérisation de GR au niveau des GREs (Luisi *et al.*, 1991). Il est également impliqué dans la stabilisation de la liaison de GR. Plusieurs

travaux montrent la transmission d'information entre le DBD et AF-1 (Kumar et Thompson, 1999). En effet, les GREs peuvent dans ce contexte être considérés comme des ligands allostériques induisant un changement de conformation au niveau de AF-1 et déterminant les co-régulateurs associés (Lefstin et Yamamoto, 1998).

Le domaine de liaison du ligand De même que pour la plupart des RNs, le LBD de GR est composé de 12 hélices α repliées en une structure globulaire offrant une poche centrale où se lie le ligand. GR α et GR β diffèrent au niveau de ce domaine, le premier comportant 50 acides aminés après la position 727 tandis que le second présente 15 acides aminés différents de ceux présents dans l'isoforme α . Toutefois, dans le cas de GR, la structure cristallographique révèle un mode spécifique de dimérisation et de reconnaissance de coactivateurs (Bledsoe *et al.*, 2002) : L'hélice la plus C-terminale (l'hélice 12) contient le sous domaine AF-2 important pour le recrutement de coactivateurs et de corépresseurs. Lorsque le ligand est lié, celui-ci est "verrouillé" par le changement de position de l'hélice 12. Le LBD présente alors une surface favorable à la liaison de coactivateurs (Bledsoe *et al.*, 2002).

2.4.3 Dimérisation des récepteurs aux glucocorticoïdes

Les GRs sous forme inactive sont cytoplasmiques, et forment des complexes multiprotéiques avec des protéines chaperonnes et de choc thermique (p23, Src, HSP90, HSP70, HSP56 (protéine de choc thermique de 56 kDa, "heat-shock protein, 56 kDa") et HSP40 (protéine de choc thermique de 40 kDa, "heat-shock protein, 40 kDa")) et des immunophilines. (Baulieu, 1987; Pratt *et al.*, 2006). La liaison du ligand sur GR entraîne un changement de conformation conduisant à la dissociation de ces complexes inhibiteurs (Groyer *et al.*, 1987). Les GRs activés forment ensuite des homodimères (Wrange *et al.*, 1989) se liant à l'ADN au niveau de GREs et régulant la transcription de gènes cibles. La spécificité de reconnaissance des éléments de réponse par GR dépend ainsi de l'état de dimérisation de ce dernier (Eriksson et Wrange, 1990).

Seul GR α possède une activité trans-activatrice. Toutefois, GR α est capable de

former des dimères avec GR β , empêchant ainsi la formation d'homodimères actifs de GR α (Oakley *et al.*, 1999). GR β est en effet capable d'entrer en compétition avec GR α pour le recrutement de coactivateurs, en particulier de la famille p160 (Yudt *et al.*, 2003; Charmandari *et al.*, 2005).

Bien que de façon minoritaire, GR est également capable de former des hétérodimères avec des récepteurs pour d'autres corticostéroïdes, notamment MR (Trapp *et al.*, 1994; Savory *et al.*, 2001) et AR (récepteur aux androgènes) (Chen *et al.*, 1997). Au sein d'une cellule, la quantité relative de GRs, MRs et de ligand détermine quel dimère se constitue. Les différentes combinaisons de dimères et de ligands permettent ainsi de produire des complexes possédant des propriétés spécifiques de liaison à l'ADN et de trans-activation. L'hétérodimérisation entre MR et GR permet ainsi un autre niveau de régulation des gènes cibles. Dans le cas de l'hétérodimérisation avec AR et MR, il semble que l'interface de dimérisation du DBD puisse jouer un rôle dans l'inhibition croisée de leur activité (Chen *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

Enfin, GR est capable de former des multimères et d'induire la transcription de certains gènes cibles indépendamment de sa capacité à former des homodimères via le DBD (Adams *et al.*, 2003).

2.4.4 Les éléments de réponse aux glucocorticoïdes

2.4.4.1 Les éléments de réponse aux glucocorticoïdes classiques

Les GREs sont principalement représentés par le palindrome 5'AGAACA n nnTGTTCT3'. Celui-ci peut cependant être dégénérée (Nordeen *et al.*, 1990; Figure 2.9 A et B). En particulier, l'espacement entre les deux demi-sites, habituellement 3 pb, peut affecter l'espacement entre les interfaces de dimérisation des DBDs des deux monomères (Watson *et al.*, 2013). Cette interaction a été reliée à la spécificité d'action des GRs activés, modulant l'amplitude de l'induction de gènes cibles (Meijssing *et al.*, 2009).

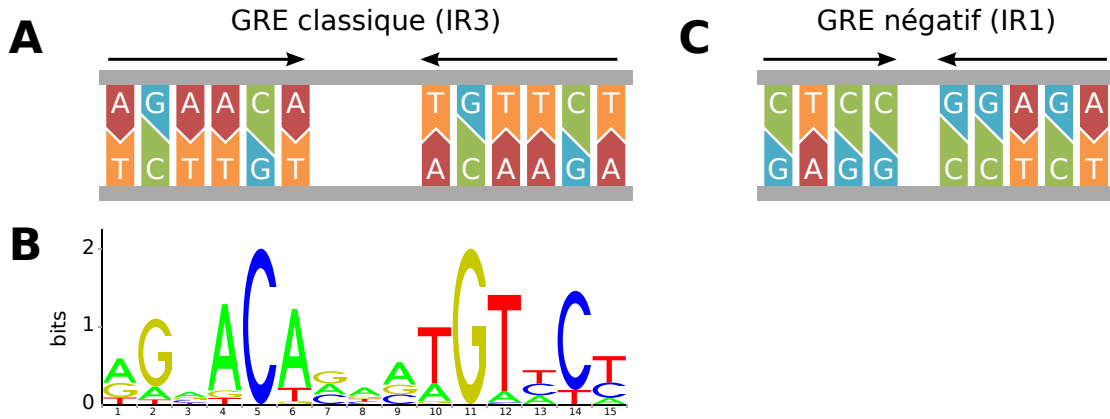


FIGURE 2.9 – Élément de réponse aux glucocorticoïdes. A) Séquence canonique d'un GRE. B) modèle canonique de GRE en représentation "sequence logo" obtenue à partir de la base de données JASPAR (Mathelier *et al.*, 2014). Malgré une séquence consensus de type IR3 (5'AGAACA...TGTTCT), celle-ci peut présenter des variations. C) Séquence consensus d'un GRE négatif mis en évidence par Surjit *et al.* (2011).

2.4.4.2 Éléments de réponse aux glucocorticoïdes composites

À la fin des années 1980, plusieurs travaux ont été menés dans le but d'élucider la spécificité spécifique de gènes du type de régulation transcriptionnelle médiée par les GCs. Sakai *et al.* (1988) mirent pour la première fois en évidence l'existence de GREs associés à de la répression transcriptionnelle. Diamond *et al.* (1990) ont qualifié ces GREs de cGREs (éléments de réponse composites aux GCs). Ce sont des éléments cis-régulateurs contenant des éléments de réponse proches pour des facteurs de transcription distincts (typiquement cJun/cFos et NF- κ B) et représentent ainsi des unités fonctionnelles minimales offrant un niveau de régulation de la transcription basée sur une combinatoire de facteurs. Pearce et Yamamoto (1993) ont montré que les interactions croisées entre GCs et MCs pouvaient passer par de tels mécanismes.

2.4.4.3 Éléments de réponse négatifs aux glucocorticoïdes

Enfin, certains GRE semblent être intrinsèquement associés à la répression de gènes cibles, sans association avec d'autres facteurs de transcription. Bien que leur existence reste évasive, Surjit *et al.* (2011) mirent en évidence l'existence de véritables nGREs (éléments de réponse négatifs aux GCs) capables de médier de façon directe la trans-répression de gènes cibles par GR. Ces nGREs ont été caractérisés comme étant des IR1s (palindromes séparés par 1 pb, "inverted repeats

separated by 1 bp”) dont la séquence (5'-CTCCnGGAGA-3') diffère radicalement avec celle de GREs classiques (Figure 2.9 C).

La variété des différents GREs et les conséquences de cette diversité sur la mécanistique d'action des GRs suggèrent ainsi un rôle important de la topologie des GREs, qui pourrait être à l'origine des différences de régulation de la transcription par un même facteur. Toutefois, des études plus récentes à l'échelle du génome (permettant l'analyse sur un grand nombre de cas) suggèrent que malgré l'importance de leur topologie, les GREs ne sont dans la majorité des cas pas suffisants pour orienter l'effet des GCs *via* GR, et que les niveaux locaux d'acétylation de la chromatine pourraient y jouer un rôle important (Uhlenhaut *et al.*, 2013).

2.4.5 Mécanismes de régulation de l'expression de gènes cibles des glucocorticoïdes

2.4.5.1 La trans-activation

La transactivation de gènes cibles par GR repose sur les mécanismes généraux d'action des RNs et fait appel au recrutement de co-activateurs par le récepteur lié par les GCs. De façon générale, les GCs vont par ce mécanisme induire la transcription de gènes cibles dont les mieux caractérisés sont des immunosuppresseurs ou anti-inflammatoires tels que IL-10 (interleukine 10) (Mozo *et al.*, 2004), annexine-1 (Philip *et al.*, 1997) ou encore I κ B (inhibiteur de κ B) (Auphan *et al.*, 1995) (pour revue Newton, 2000). La trans-activation par GR implique l'interaction de ce dernier avec des complexes coactivateurs et d'autres facteurs de transcription, ainsi que des interactions entre domaines de GR (Bledsoe *et al.*, 2002; Kumar et Thompson, 2005). Les modifications post-traductionnelles (acétylation ou méthylation) d'histones et de constituants du complexe facilitent le remodelage de la structure locale de la chromatine et induisent ainsi un état plus permissif à la transcription (Aranda et Pascual, 2001). Deux classes de co-régulateurs sont recrutées. L'une affecte directement le remodelage de la chromatine tandis que l'autre interagit directement avec la machinerie transcriptionnelle. Les

co-régulateurs les mieux décrits lient le domaine AF-2 *via* le motif LXXLL. Ceux-ci incluent CBP/p300 et différents membres de la famille SRC, dont GRIP1 (protéines interagissant avec GR 1, “GR-interacting protein 1”) qui recrutent notamment des HAT ((Fryer et Archer, 1998) ; Figure 2.10 a).

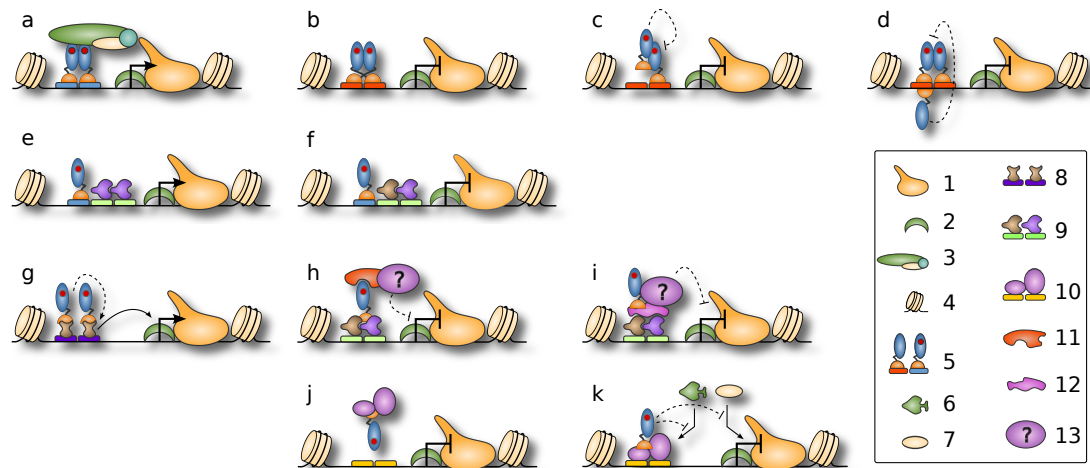


FIGURE 2.10 – Mécanismes d’action des GRs. Transactivation classique (a), liaison à un cGRE/AP-1 près d’un homodimère c-Jun (e), potentialisation de l’activation de la transcription par STAT-5 (transducteur du signal et activateur de la transcription 5, “signal transducer and activator of transcription 5”) (g). Transrepression par liaison à des nGREs : changement de conformation de GR (b), liaison directe à l’ADN d’un seul des deux monomères (c), liaison du nGRE par un trimère de GR (d). GR peut également réprimer l’activation de la transcription médiée par un dimère c-Fos/c-Jun : par liaison à un cGRE (f), par recrutement de GRIP1s (h) ou après être recruté par NTRIP6s (protéines nucléaires interagissant avec TR 6, “nuclear TR-interacting protein 6s”) (i). Enfin, GR peut inhiber l’effet transactivateur de NF- κ B par séquestration de p50/p65 (j) ou en empêchant l’action de IRF-3 (facteur de régulation des interférons 3, “interferon regulatory factor 3”) et PTEFb (facteur positif d’élongation de la transcription b, “positive transcription elongation factor b”) (tous deux requis pour l’effet transactivateur de NF- κ B). 1) ARN-Pol-II (ARN polymérase II). 2) TBP. 3) Complexe CBP/p300/HAT. 4) Histone. 5) GR lié ou non à une molécule de GC (rond rouge). Les traits rouge et bleu représentent respectivement un nGRE et un GRE classique. 6) IRF-3. 7) PTEFb. 8) Hétérodimère de STAT-5 liés à un élément de réponse (traits violets) à STAT-5. 9) Hétérodimère de c-Fos (marron) et c-Jun (violet) lié à un élément de réponse à AP-1 (traits verts). 10) Dimère p50/p65 lié à un élément de réponse à NF- κ B. 11) GRIP1. 12) NTRIP6. 13) Cofacteur non-identifié.

L’effet trans-activateur de GR passe également par l’interaction avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de base. En effet, la liaison du DBD à un GRE provoque un changement de conformation au niveau du domaine AF-1 qui augmente considérablement l’interaction de ce dernier avec la TBP (Kumar *et al.*, 2004).

Enfin, GR interagit également directement avec d'autres facteurs de transcription, notamment des homodimères cJun au niveau de GREs composites (Figure 2.10 *e*) et avec STAT-5 (Stoecklin *et al.*, 1997) sans nécessairement se lier directement à l'ADN (Figure 2.10 *g*).

2.4.5.2 La trans-répression indirecte

Sous ce terme sont regroupés plusieurs concepts de répression de la transcription de gènes cibles nécessitant l'interaction de GR avec d'autres facteurs de transcription. Le premier correspond à l'interaction de GR avec d'autres facteurs de transcription au niveau de cGREs, prévenant ainsi leur capacité trans-activatrice (Figure 2.10 *f*). Ce type de régulation a été bien décrit dans le cadre de l'interaction entre GR et NF- κ B (Ray et Prefontaine, 1994) et cFos/cJun (Pearce et Yamamoto, 1993). De façon intéressante, GRIP1, un membre de la famille p160 jouant le rôle de coactivateur dans le cadre de la trans-activation par IRF-3, est impliqué dans la trans-répression par GR (Reily *et al.*, 2006). GR peut se lier à des dimères cJun/cFos liés à des éléments de réponse AP-1 et médier une répression indirecte de type "tethering" (attachement) en recrutant GRIP1 (Rogatsky *et al.*, 2002), (Figure 2.10 *h*) ou en étant recruté par NTRIP6 (Figure 2.10 *i*). Il a été également montré que dans le contexte de l'activation de gènes cibles de NF- κ B, GR peut séquestrer p50/p65, prévenir sa liaison à l'ADN et son activité trans-activatrice (Figure 2.10 *j*, Mukaida *et al.* (1994); De Bosscher *et al.* (2003)). Dans le cas de certains gènes cibles, GR activé peut prévenir la phosphorylation du domaine carboxy-terminal de ARN-Pol-II (Nissen, 2000) en inhibant le recrutement de PTEFb (Luecke et Yamamoto, 2005), voir Figure 2.10 *k*).

2.4.5.3 La trans-répression directe

Une des premières caractérisation d'un nGRE permettant la répression via GR directement lié à l'ADN a été celle du gène POMC (proopiomélanocortine). La répression de l'expression de ce gène par les GC est importante dans le contrôle de l'axe HPA. Pour ce gène, il a été montré par Drouin *et al.* (1993) que sa répression par les GCs passe par la liaison séquentielle d'un homodimère de GR, suivie par la liaison d'un monomère de GR sur le côté opposé de la double hélice d'ADN

(Figure 2.10 *d*) au niveau d'un élément de réponse présentant une similitude limitée avec la séquence canonique. GR peut également exercer une activité de répression par le biais d'un dimère partiellement lié à l'ADN tel que décrit par Lefstin et Yamamoto (1998) (Figure 2.10 *c*), ou par un changement de conformation particulier défini par le nGRE en lui même (Figure 2.10 *b*). La répression transcriptionnelle directe via la liaison directe de GR à des nGREs ayant une séquence consensus n'a pour le moment été décrite que par Surjit *et al.* (2011). Dans ce modèle, la liaison de GRs activés au niveau de nGREs induit spécifiquement le recrutement des complexes corépresseurs SMRT et NCoR. Pour revue sur la trans-répression directe et indirecte par les GRs, voir Dostert et Heinzl (2004).

2.4.6 Effets non-génomiques des glucocorticoïdes

Les effets non-génomiques des GCs tels que décrits par Stahn et Buttgerit (2008) peuvent être répartis en trois catégories.

2.4.6.1 L'interaction avec les membranes cellulaires

En tant que dérivés du cholestérol, les GCs comme les autres stéroïdes peuvent, à fortes concentrations, s'insérer dans les membranes cellulaires et en modifier les propriétés physico-chimiques, dont la peroxydation des lipides et leur perméabilité. Au niveau des mitochondries, l'insertion des GCs pourrait contribuer à l'inhibition de la phosphorylation oxydative en favorisant la fuite de protons. Une diminution de la production d'ATP par certains types cellulaires du système immunitaire pourrait ainsi contribuer aux effets anti-inflammatoires des GCs (Buttgerit et Scheffold, 2002).

2.4.6.2 Effets médiés par les récepteurs aux glucocorticoïdes cytosoliques

Les GCs peuvent également agir selon des mécanismes d'action non-génomiques impliquant des GRs cytosoliques. En particulier, la liaison des GCs sur leur récepteurs induit la dissociation de complexes multiprotéiques séquestrateurs (voir sous-section 2.4.3). Les différents partenaires de ces complexes se retrouvent alors

sous forme libre dans le cytoplasme et peuvent exercer des fonctions moléculaires distinctes de l'action de GR. C'est notamment le cas de Src (proto-oncogènes codant pour des tyrosine kinases Src, "Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src"), HSP70 et HSP90 (Croxtall *et al.*, 2000; Marchetti *et al.*, 2003; Tumlin *et al.*, 1997) qui ont des effets sur le contrôle de la localisation nucléaire de certaines protéines et sur la transduction du signal. De plus, le contrôle de la libération de molécules jouant un rôle dans la croissance et le métabolisme cellulaire (e.g. l'acide arachidonique) par divers facteurs peut être inhibé par les GCs via leurs récepteurs cytoplasmiques, mais indépendamment de tout intermédiaire transcriptionnel (Croxtall *et al.*, 2000).

2.4.6.3 Effets médiés par les récepteurs aux glucocorticoïdes liés aux membranes

L'existence de GRs et MRs membranaires a été observée chez les amphibiens et les rongeurs (Orchinik *et al.*, 1991; Gametchu *et al.*, 1999). Ces GRs membranaires semblent résulter d'isoformes spécifiques (Bartholome *et al.*, 2004) et leur quantité corrèle inversement avec la sévérité de symptômes de RA, une maladie auto-immune. Bien que le détail de ces mécanismes reste toutefois non-élucidé, il a été récemment observé que la DEX (dexaméthasone) inhibe la signalisation des récepteurs des cellules T *via* l'inhibition de l'activité de protéines tyrosine kinases spécifiques de ce type cellulaire (Löwenberg *et al.*, 2006).

2.4.7 Effets sur le transcriptome

Alors qu'au même titre que les HTs les GCs agissent sur la transcription de gènes cibles, la plupart des études destinées à caractériser les effets transcriptomiques globaux des GCs restent biaisés par la connaissance actuelle de leur fonction biologique et restent centrées autour de leur rôle central et immunitaire. Un des tissus dans lequel GR est fortement exprimé est l'hippocampe. Dans ce tissu, l'action des GCs semble pouvoir passer aussi bien par GR que MR, ces derniers régulant des gènes pouvant être classés dans des catégories fonctionnelles similaires, incluant la structure neuronale, l'activité motrice, l'adhésion cellulaire, la neurotransmission, la transduction du signal et le trafic vésiculaire. (Datson *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que la signalisation croisée entre MCs et GCs est plus ou moins découplée

selon tissu et contribue par ce biais aux effets pléiotropes des GC (par exemple entre les reins et l'hippocampe). Dans l'hippocampe, l'exposition chronique à des GCs induit la régulation de gènes dont l'expression est également altérée au cours du vieillissement et active le métabolisme neuronal tout en réprimant la réactivité et l'inflammation de la composante gliale. Dans ce contexte les gènes induits participent notamment à l'apprentissage et la plasticité neuronale, la différenciation cellulaire, le métabolisme du glucose, la biosynthèse du cholestérol. Parallèlement, les gènes réprimés sont associés à l'inflammation, au métabolisme des cellules gliales et la structure extracellulaire (Chen *et al.*, 2013; Carter *et al.*, 2012).

L'analyse à grande échelle du transcriptome modulé par les GCs dans le foie montre un enrichissement en gènes cruciaux dans les cycles circadiens, incluant *mPer1*, *Bmal1*, *mCry1* et *Dbp*. Dans ce contexte, *HNF-4* est un modulateur important de la transcription circadienne des gènes cibles des GC (Reddy *et al.*, 2007).

Enfin, les GCs sont essentiels dans le développement cardiaque par leur action sur l'expression de gènes impliqués dans la maturation et l'organisation des myofibrilles, la contractilité et le métabolisme calcique et énergétique Rog-Zielinska *et al.* (2013).

L'utilisation du poisson-zèbre a permis d'appréhender de façon comparative le rôle des GCs durant le développement précoce. Dans ce modèle, les gènes régulés par les GCs sont impliqués dans la neurogénèse, le développement de l'œil et la formation des muscles squelettiques et cardiaques (Nesan et Vijayan, 2013).

L'état de l'art sur les effets globaux que les GCs exercent sur la transcription de gènes cibles souffre d'un biais vers l'étude des tissus nerveux et de régions du SNC. Il reste donc difficile de prendre du recul et de composer une image générale des effets spécifiques de tissus. Toutefois, un thème récurrent qui émerge de l'ensemble de ces études est la contribution forte des GCs à réguler des gènes impliqués dans la réponse immune, ce qui est en accord avec les travaux passés.

Deuxième partie

Objectifs et Stratégies

Expérimentales

Contexte et Objectifs du Projet

3.1 Contexte : La période périnatale

3.1.1 Une perturbation de la physiologie à la période périnatale peut avoir des effets délétères pour l'organisme

Il est supposé que l'exposition à des conditions adverses au moment de la période périnatale peut susciter des adaptations développementales servant à maximiser les chances de survie durant cette période et à préparer l'organisme à une variété d'environnements potentiellement hostiles (Angelier et Wingfield, 2013; Crespi *et al.*, 2013; Patterson *et al.*, 2014). Ces adaptations apparentes peuvent varier en fonction des individus (Cockrem, 2013). Ces processus, bien qu'adaptatifs, peuvent malheureusement aussi se révéler être inadéquats plus tard durant la vie et peuvent altérer les processus normaux de vieillissement. Il est maintenant clairement établi qu'une exposition précoce à divers stress contribue au développement de plusieurs pathologies ou syndromes se déclarant plus tard durant la vie, incluant des maladies mentales et cardiovasculaires, une prédisposition à l'obésité et au cancer (Braun *et al.*, 2013; Harris et Seckl, 2011; Plagemann, 2006; Challis *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2013; Barnes et Ozanne, 2011). Le fait qu'une exposition ponctuelle à un stimulus/stress s'accompagne d'une réponse

biologique beaucoup plus tardive suggère fortement qu'il existe une composante épigénétique dans la genèse de ces pathologies ultérieures (pour exemple Weaver *et al.*, 2004; Begum *et al.*, 2013; Crudo *et al.*, 2012; Drake *et al.*, 2012). La modulation de ces processus dans un contexte physiologique est en partie régulée par la réponse au stress. Ainsi, un stress prolongé ou particulier dans son origine ou sa manifestation peut se traduire par la favorisation de pathologies dans un contexte multifactoriel. Chez une vaste majorité des vertébrés, la période périnatale est marquée par des voies de signalisation endocriniennes qui contrôlent de nombreux processus développementaux, physiologiques et morphologiques. Deux de ces signaux endocriniens sont les GCs et les HTs.

3.1.2 Rôles des glucocorticoïdes

Les GCs jouent un rôle important durant la période périnatale. Leurs rôles dans le développement des poumons chez l'homme en font une cible thérapeutique de choix afin d'induire la maturation du système respiratoire chez les nouveaux nés prématurés (National Guideline Clearinghouse, 2010). Les GCs sont notamment utilisés en routine pour le traitement de l'asthme (Clifton, 2005; Osei-Kumah *et al.*, 2011) et l'hyperplasie congénitale de la glande surrénale (Forest, 2004). Ils peuvent à eux seul déclencher la parturition chez les ovins et les humains (Mati *et al.*, 1973; Whittle *et al.*, 2001). L'administration pharmaceutique de corticostéroïdes n'est toutefois pas la seule source de GCs. Ces derniers étant en effet les médiateurs principaux de la réponse au stress à moyen ou long terme (voir sous-section 2.3.4), les conditions environnementales durant la gestation ou à la naissance peuvent influencer sur leur taux circulants, contribuant ainsi à l'établissement de phénotypes altérés et potentiellement adaptés à un environnement particulier.

3.1.3 Rôles des hormones thyroïdiennes

Au cours de la période périnatale, les HTs jouent un rôle crucial dans la maturation de nombreux tissus et organes, et les pathologies associées à la perturbation de leur signalisation sont parmi les plus répandues dans le monde (voir introduction). D'un côté, une déficience ponctuelle en HTs à la

naissance induit le “crétinisme”, un syndrome à large spectre, allant de défauts de croissance et de développement cognitif modéré jusqu’à des dommages cérébraux et neurologiques graves (Delange, 1994; Chen et Hetzel, 2010). De l’autre, l’excès d’HT se traduit par la thyrotoxicose, et potentiellement le décès. Aussi bien l’hypothyroïdisme que l’hyperthyroïdisme ont été associés à des risques accrus de maladies cardiovasculaires, de pathologies dégénératives du squelette et de cancers. De façon intéressante, la période périnatale est marquée chez la quasi-totalité des vertébrés par une augmentation transitoire et marquée de la concentration circulante en HTs. La reproduction artificielle de ce pic d’HTs à la naissance suffit à prévenir des effets délétères dus à un hypothyroïdisme congénital.

3.2 Objectifs

3.2.1 Caractérisation des interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes

Plusieurs lignes d’évidence suggèrent une interaction croisée entre les HTs et les GCs, en particulier *via* la régulation de l’expression des enzymes responsables de l’activation ou l’inactivation des HTs (DIO2 et DIO3 respectivement), contribuant ainsi à réguler le métabolisme périphérique des HTs et leur disponibilité locale. Il est intéressant de noter que les GCs exercent une action stimulatrice sur le métabolisme des HTs durant le développement embryonnaire. Chez les fœtus ovins par exemple, l’administration de cortisol résulte en une conversion accrue de la T_4 en T_3 dans le foie et les reins (Wu *et al.*, 1978), et contribue à l’augmentation de T_3 circulante (Darras *et al.*, 1996). Au contraire, dans les périodes post-embryonnaires de la vie, les GCs ont tendance à inhiber la fonction thyroïdienne (Chopra *et al.*, 1975; Decuypere *et al.*, 1983; Bianco *et al.*, 1987).

L’exposition aux GCs provoque chez le rat – et à long terme – une baisse de l’expression de la TRH (qui induit la synthèse de TSH qui elle même va favoriser la synthèse d’HTs, voir sous-section 1.2.3). Ce changement n’a pas d’effet sur les niveaux d’HTs sauf à la période périnatale (au moment où il doivent être élevés) où ils sont inférieurs à la normale (Carbone *et al.*, 2012). Il a aussi

été observé que les HTs étaient à l'origine de certains effets pro-inflammatoires attribués aux GCs (Montesinos *et al.*, 2012). En effet, malgré leur action anti-inflammatoire, les GCs ne sont pas toujours capables de contrer l'immunostimulation induites par les HTs. Enfin, il a été montré dans un des modèles les plus classiques d'exposition aux GCs – soit par administration, soit résultant d'un stress maternel – que l'augmentation du risque de développer des anomalies comportementales, métaboliques ou endocriniennes suite à des modifications épigénétiques Weaver *et al.* (2004), impliquait la signalisation thyroïdienne (Hellstrom *et al.*, 2012). Les interactions croisées entre HTs et GCs font que l'altération des niveaux de GCs peut influencer la signalisation thyroïdienne à un moment de la vie ou son rôle dans le développement post-embryonnaire peut avoir des conséquences délétères à plus ou moins long terme. Cette altération des rhéostats physiologiques à la période périnatale peut ainsi être à l'origine d'une certaine plasticité phénotypique, permettant à l'organisme de s'adapter de façon précoce à un environnement adverse.

Malgré leur contribution importante dans le cadre des interactions individu-environnement, et leur impact sociétal important chez l'humain, le détail moléculaire des interactions entre ces deux voies de signalisation est mal caractérisé.

Bien qu'une partie des effets des GCs sur la signalisation thyroïdienne puisse passer par une régulation de la disponibilité en ligand, certains gènes comme KLF9 (facteur similaire à krüppel 9, “krüppel-like factor 9”) sont régulés de façon directe par les deux hormones (Denver et Williamson, 2009; Bagamasbad *et al.*, 2012). Ceci suggère que les interactions HTs – GCs font intervenir un ensemble de mécanismes moléculaires. Nous avons donc entrepris d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Quelle est la nature des interactions entre les voies de signalisation des HTs et des GCs ?
- Quelle est l'ampleur de ces interactions ; se traduisent-elles par une reprogrammation majeure de l'expression des gènes au niveau des tissus cibles ?
- Les interactions entre GCs et HTs sont-elles dominées par les conséquences fonctionnelles de la modulation de la disponibilité en ligand ?
- Quels sont les processus biologiques affectés ?

Pour ce faire, nous avons entrepris de mesurer à grande échelle les effets d'un traitement aux HTs, aux GCs, et d'un co-traitement avec les deux hormones sur l'abondance relative des transcrits. Cette démarche permet de capturer la réponse de l'organisme à l'échelle du transcriptome, et ainsi mettre en évidence des programmes et des réseaux de régulation importants durant une phase du développement où ces deux hormones jouent un rôle crucial.

Nous avons choisi d'aborder ces questions dans le cadre de la métamorphose des amphibiens Anoures. Comme décrit dans les sections suivantes, ce modèle s'avère particulièrement adapté.

Le Modèle de la Métamorphose des Amphibiens

4.1 Le développement du Xénope : un modèle de développement des amphibiens Anoures

Le développement des amphibiens est caractérisé par une ontogénie incluant la transition d'un état larvaire à un état adulte. Après l'éclosion et une période de croissance, le têtard va ainsi devoir subir une transition physiologique, anatomique et environnementale rapide et irréversible marquant la transition de l'état larvaire à l'état d'adulte, la métamorphose. Le développement du Xénope peut se résumer à 4 phases principales décrites et formalisées en 66 stades chez *X. laevis* (*Xenopus laevis*) par Nieuwkoop et Faber (1956), les stades NF (stades Nieukoop-Faber). Ces stades sont caractérisés par des étapes précises du développement morphologique et anatomique.

4.1.1 Le développement embryonnaire et l'organogenèse

Cette phase du développement correspond à la mise en place précoce des structures et fonctions qui donneront lieu à la formation d'un têtard autonome. Elle englobe les premiers stades de développement, à partir de la fécondation de l'ovocyte jusqu'à l'acquisition de la capacité à se nourrir de façon autonome.

Après la fécondation, le zygote va se développer par mitoses successives rapides et synchrones. La dynamique de ces premières étapes est basée sur la synthèse d'ARN maternels accumulés dans l'ovocyte, et se fait donc en absence de transcription. Les gènes zygotiques ne s'expriment qu'à partir de la transition mid-blastuléenne (stade NF 8). Durant la gastrulation (stades NF 9-13), les feuilletts embryonnaires se mettent en place. La neurulation, qui a lieu aux stades NF 13-20, est suivie par l'organogenèse (stades NF 20-45). Le têtard commence à se nourrir à partir des stades NF 44-45, tandis que son intestin et les branchies se développent. Ceci marque la fin de l'organogenèse et le début de la pré-métamorphose.

4.1.2 La pré-métamorphose

À partir du stade NF 45, le têtard va essentiellement croître, passant d'une larve d'environ 5 mm à une larve de plus de 2 cm au stade NF 50. Les derniers stades de la pré-métamorphose sont marqués par la maturation fonctionnelle de la glande thyroïde et le début de sécrétion d'HTs endogènes.

4.1.3 La pro-métamorphose

Durant cette phase, les niveaux d'HTs augmentent progressivement mais restent modestes. La pro-métamorphose est caractérisée par le développement des pattes postérieures à partir du stade NF 51 (Figure 4.1). Le têtard continue à grandir et se prépare à la transition drastique que représente le climax de la métamorphose.

4.1.4 Le climax de la métamorphose

La fin de la pro-métamorphose est morphologiquement marquée par l'apparition des membres antérieurs vers le stade NF 59. Ceux-ci ont commencé à se développer presque en même temps que les membres inférieurs, mais sont restés jusqu'alors sous l'épiderme. Durant cette phase, le têtard cesse de s'alimenter, une conséquence du profond remodelage de son épithélium intestinal. La structure squelettique du têtard, et en particulier de la tête, est profondément remodelée pour laisser place au développement du tronc. La fin de la métamorphose est marquée par la résorption rapide de la queue (Figure 4.1). De façon générale, la totalité des tissus larvaires

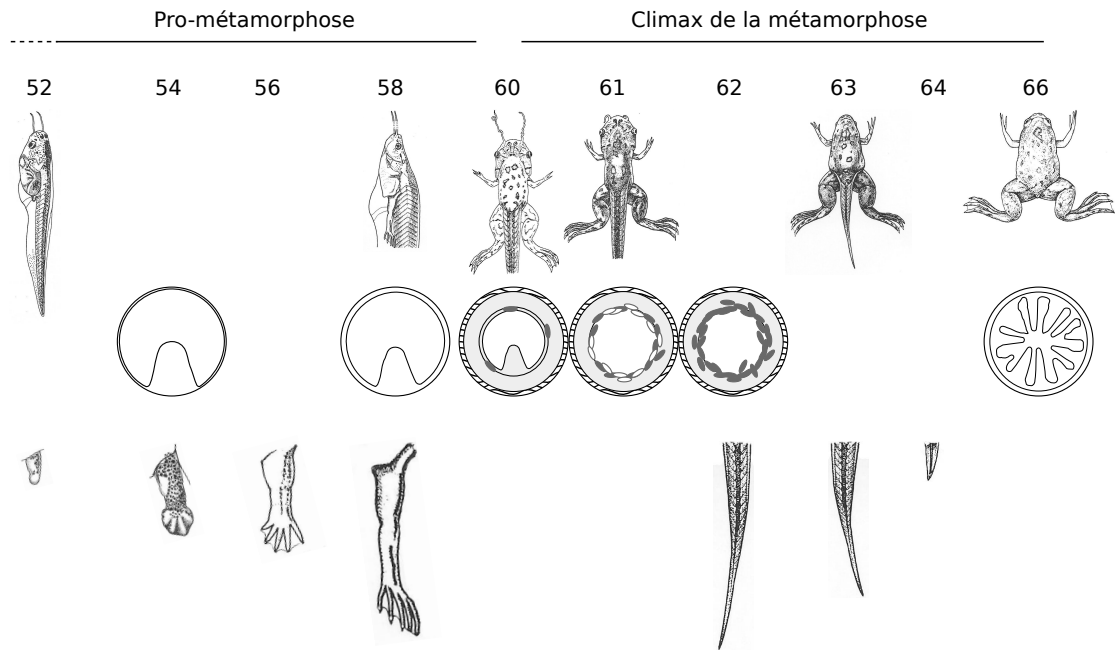


FIGURE 4.1 – Changements anatomiques durant la métamorphose du Xénope. Figure inspirée de Shi *et al.* (2001). Les modifications morphologiques et biochimiques majeures survenant durant la métamorphose sont présentées table 4.1. La longueur des queues entre les stades NF 63-66 et des pattes entre les stades NF 52-58 sont à l'échelle. Les schémas de coupes transversales d'intestins mettent en évidence les différences entre le système digestif larvaire et adulte. Le premier ne possède qu'une involution, et est riche en tissus conjonctif. Le second possède un épithélium comportant plusieurs replis, intégré dans une structure complexe présentant tissus conjonctifs entre la couche épithéliale et la couche musculaire à la périphérie. Les ovales gris foncés et blancs représentent respectivement les cellules épithéliales adultes en prolifération et les cellules épithéliales larvaires en cours d'apoptose. Les schémas des différents stades sont issus de Nieuwkoop et Faber (1956).

sont remodelés ou résorbés. Le Tableau 4.1 présente les modifications anatomiques et biochimiques majeures survenant durant la métamorphose.

Le climax de la métamorphose marque la période durant laquelle les modifications les plus spectaculaires ont lieu. Il en résulte des modifications qui vont séparer écologiquement les grenouilles adultes de leur progéniture. En effet, la métamorphose s'accompagne d'un changement de mode vie (alimentation, locomotion ...). Cette transition écologique est rapide (quelques jours à quelques semaines selon l'espèce), et nécessite une coordination temporelle et spatiale de la réponse au signal déclenchant la métamorphose. Ce signal a été montré par Gudernatch en 1912 comme étant les HTs. Il observait alors que l'administration d'extraits de glande thyroïde à l'eau d'aquariums contenant des têtards induisait la métamorphose prématurée de ces derniers. Chez tous les vertébrés, les HT

Tissu	Réponse	
	Morphologique	Biochimique
Cerveau	Remodelage, croissance des axones, prolifération et mort cellulaire	Division cellulaire, apoptose, synthèse protéique
Foie	Remodelage, différenciation fonctionnelle	Induction des enzymes du cycle de l'urée et de l'albumine ; Passage de l'hémoglobine larvaire à l'hémoglobine adulte
Œil	Repositionnement ; nouvelles connexions et neurones rétinaux ; remodelage de la lentille	Transformation des pigments visuels (porphyropsine-rhodopsine)
Peau	Remodelage ; formation des glandes granulaires ; kératinisation ; apoptose	Induction des collagènes, kératines et magainines adultes ; induction de collagénases
Membres	Formation <i>de novo</i> d'os, de cartilage ; de muscle, de nerfs, d'épithélium	Prolifération et différenciation ; apoptose ; chondrogenèse et ossification
Poumons	Formation <i>de novo</i> d'épithélium	Prolifération et différenciation
Queue, Branchies	Régression complète	Apoptose ; destruction de la matrice extracellulaire ; induction et activation d'enzymes lytiques (collagénases, metalloprotéinases, nucléases) ; Prolifération des lysosomes ; prolifération des macrophages
Pancréas, Intestins	Profond remodelage	Reprogrammation du phénotype ; induction de protéases, protéines de liaison aux acides gras et stromelysine-3
Système immunitaire	Redistribution des types populations cellulaires, changement de soi	Altération du système immunitaire et apparition de nouveaux composants immuno-compétents ; Prolifération transitoire dans le contexte des tissus apoptotiques
Muscle	Changement de motilité, croissance et différenciation ; apoptose	Transition forme larvaire vers adulte, induction de la chaîne lourde de myosine

TABLE 4.1 – Effets morphologiques et biochimiques survenant durant la métamorphose. Tiré de Tata (2006).

jouent un rôle important pendant une fenêtre de temps courte du développement post-embryonnaire, et vont être indispensables à la maturation de nombreux tissus (Laudet, 2011). La conservation au cours de l'évolution de cette fenêtre d'action et des mécanismes d'actions impliqués font de la métamorphose des amphibiens un modèle de choix pour l'étude des HTs.

4.2 Hormones thyroïdiennes et métamorphose

Chez les amphibiens, les HTs jouent véritablement le rôle d'interrupteur à usage unique permettant l'initiation de la métamorphose (Shi, 1998). L'élucidation du rôle et des mécanismes d'action des HTs a énormément bénéficié de ce modèle et réciproquement (Wong *et al.*, 1995, 1998a).

4.2.1 Taux d'hormones thyroïdiennes circulantes au cours du développement du Xénope

Gudernatsch observait il y a plus d'un siècle que de l'extrait de glande thyroïde, et uniquement de cet organe, était capable d'induire la métamorphose de têtards. Il faudra toutefois attendre 1977 pour que les niveaux de T_3 et de T_4 chez des têtards en cours de métamorphose soient mesurés (Leloup et Buscaglia, 1977). Bien que la glande thyroïde ne devienne fonctionnelle qu'à partir du stade NF 45, les stocks d'HTs d'origine maternelle sont détectés dès les premiers stades (Morvan Dubois *et al.*, 2006). Au cours de la métamorphose, les niveaux HTs endogènes augmentent progressivement à partir du stade NF 54 jusqu'au stade NF 59. Durant les stades ultérieurs, au moment du climax, les taux d'hormones augmentent considérablement et transitoirement (quelques jours), pour revenir à des niveaux basaux chez la grenouille juvénile. Il est à noter que le pic de T_4 est plus étalé que celui de la T_3 , et atteint son maximum un peu plus tardivement (stade NF 63 vs 61) (voir Figure 1 Grimaldi *et al.*, 2012; Annexe A- 1).

4.2.2 Compétence des tissus aux hormones thyroïdiennes et diversité d'actions

La métamorphose de l'amphibien est un processus complexe caractérisé par deux paradoxes :

- Comment les HTs, signal initiateur et indispensable de la métamorphose, peuvent avoir des effets aussi divers selon les tissus ?
- Alors que les HTs circulantes augmentent considérablement durant la métamorphose, comment les différentes étapes sont aussi finement coordonnées temporellement ?

Une partie de la réponse à ces questions prend source dans la dynamique de la compétence des différents tissus à répondre au signal thyroïdien.

4.2.2.1 Régulation de la disponibilité en ligand

L'activité des HTs est régulée en partie localement au niveau de la cellule notamment par les désiodases et les CTHBPs (protéines cytosoliques liant les hormones thyroïdiennes, “cytosolic thyroid hormone binding proteins”). Ces dernières régulent la portion libre d'HT au sein de la cellule et jouent un rôle dans leur stockage, export et métabolisme. Dans des tissus sur le point de subir un effet dramatique des HT (pousse des membres ou régression de la queue), le gène codant pour CTHBP est hautement transcrit (Shi *et al.*, 1994). Les désiodases sont, quant à elles, essentielles dans la modulation des ratios d'HT active par rapport à des précurseurs ou des métabolites inactifs. En particulier, l'expression de la DIO2 (enzyme activant les HTs) est élevée dans des tissus en cours de métamorphose, alors que l'expression de la désiodase inactivante (DIO3) est élevée dans les tissus avant et après métamorphose (Leloup *et al.*, 1981; Galton, 1989). De façon intéressante, l'expression des désiodases est connue pour être modulée par les HTs. Toutefois, Bonett *et al.* (2010) ont montré que DIO2 répondait beaucoup moins rapidement à la T_3 selon le type cellulaire.

4.2.2.2 Le modèle de la double fonction des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Un autre aspect important pour la coordination spatiale et temporelle de la capacité des différents tissus à répondre aux HTs se trouve dans les profils d'expression des TRs dont la caractérisation au cours de la métamorphose a été réalisée très tôt (Yaoita et Brown, 1990). Au cours du développement du Xénope, la combinatoire entre HT et TR, associée au modèle selon lequel la présence d'HTs détermine l'action répressive ou activatrice de leurs récepteurs, permet de dégager un rôle double de la signalisation thyroïdienne (voir Figure 1 Grimaldi *et al.*, 2012; Annexe A- 1). Ainsi durant la pré- et la pro- métamorphose, l'absence relative d'HT et l'augmentation croissante de l'expression de TR α contribue à réprimer les gènes cibles. Pendant le climax de la métamorphose, la concentration élevée en HT concomitante à l'expression de TR α et TR β contribue à l'activation de la transcription gènes cibles cruciaux durant ce processus développemental (Sachs *et al.*, 2000). L'utilisation d'animaux transgéniques exprimant des formes dominant-négative (Schreiber *et al.*, 2001; Buchholz *et al.*, 2003) ou -positive (Buchholz *et al.*, 2004) confirme le rôle important de l'activation de TR par les HTs dans le recrutement différentiel de co-régulateurs essentiel pour la métamorphose (voir Grimaldi *et al.*, 2012; Annexe A- 1).

4.2.2.3 Spécificité d'action des isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

L'étude de l'expression spatiale et temporelle des différentes isoformes de TR et l'utilisation d'analogues des HTs spécifiques ont pu mettre en évidence un rôle de TR α dans la prolifération cellulaire au niveau du cerveau et des membres postérieurs. Au contraire de TR α , l'expression de TR β est dépendante de l'augmentation de la concentration en HT au cours de la métamorphose. L'utilisation d'analogues des HT spécifiques de TR β supporte l'hypothèse de l'implication de cette isoforme dans des processus de différenciation cellulaire et d'apoptose. Pour revue, voir (Furrow et Neff, 2006; Denver *et al.*, 2009).

4.2.2.4 L'autoinduction de TR β

L'auto-induction de TR β était initialement supposée être la réponse la plus précoce au signal thyroïdien (Yaoita et Brown, 1990). Celle-ci est sous-tendue en partie par la présence d'au moins deux TREs (chez *X. tropicalis* (*Xenopus tropicalis*) Bilesimo *et al.*, 2011, quatre chez *X. laevis*, Ranjan *et al.*, 1994; Machuca *et al.*, 1995; Urnov et Wolffe, 2001) en amont du gène, suggérant que TR β s est une cible directe des HTs. Deux mécanismes peuvent expliquer le rôle de l'auto-induction de TR β dans la métamorphose. D'une part l'accumulation de TR β peut causer la sensibilisation des tissus aux HTs, amplifiant ainsi les effets de ces dernières sur l'expression de gènes cibles. D'autre part, TR β pourrait réguler un sous-ensemble de gènes et de processus distincts de ceux régulés par TR α .

Pour compléter ces informations sur la régulation de l'expression de TR β par les HTs, il est important de noter que l'utilisation de CHX (cycloheximide) a montré que la transcription de facteurs additionnels était nécessaire à l'induction maximale de TR β par la T₃. Cette hypothèse fut corroborée par la découverte d'un gène répondant plus précocement aux HTs que TR β , le gène codant pour KLF9. Il s'agit d'un facteur de transcription faisant partie de la famille des facteurs krüppel-like (Knoedler et Denver, 2014), identifié comme important dans le développement et l'extension de neurites (Scobie *et al.*, 2009). La découverte de KLF9, et le fait que TR β comprend plusieurs sites putatifs de liaison de KLF9, suggère que TR β nécessite partiellement KLF9 dans le cadre de son auto-induction (Bagamasbad *et al.*, 2008). Le modèle actuel décrit la nécessité précoce de TR α pour assurer la compétence à répondre des différents tissus, tandis que TR β est requis pour la métamorphose proprement dite. Ainsi, des variations tissu-spécifique des profils d'expression des deux TRs pourraient expliquer des dynamiques de réponses caractéristiques de chaque organe.

4.3 Rôle des glucocorticoïdes

4.3.1 Taux de glucocorticoïdes au cours de la métamorphose

De même que les HTs, les GCs sont essentiels pendant la métamorphose. Chez le têtard de *X. laevis*, la concentration en CORT est élevée pendant la pré-métamorphose, et le climax (stade NF 62, Figure 4.2), mais diminue considérablement durant la pro-métamorphose (Jolivet Jaudet et Leloup Hatey, 1984; Kloas *et al.*, 1997). Des profils similaires de concentration en GCs sont observés chez certains sauropside à l'éclosion et durant les mues, chez certains téléostéens à l'éclosion et à la métamorphose/smoltification, et chez les mammifères à la naissance (pour revue Wada, 2008).

Toutefois, les actions des GCs sur le développement des amphibiens Anoures sont difficiles à disséquer à cause de leur implication dans de nombreux processus biologiques. En particulier, les GCs inhibent fortement la croissance, aussi bien chez des têtards pré- et pro-métamorphiques. De plus, au cours de développement post-embryonnaire des amphibiens, leurs effets varient selon le stade et le statut thyroïdien, ce qui rend l'isolation de leurs effets spécifiques indépendants des autres voies de signalisation endocrines malaisée. L'administration de GCs exogènes à des têtards pré-métamorphiques inhibe en effet l'émergence des membres inférieurs (Kobayashi, 1958). L'utilisation de drogues inhibant l'action moléculaire des GCs comme le RU486, ou empêchant la production de GCs par les surrénales (Kikuyama *et al.*, 1982), inhibent la métamorphose. De plus, les GCs sont capables d'agir en synergie avec les HTs chez des têtards pro-métamorphiques (Hayes *et al.*, 1993; Hayes et Wu, 1994; Gray et Janssens, 1990) (Voir section suivante).

4.3.2 Distribution des récepteurs aux glucocorticoïdes

Au cours de la métamorphose, les GR ont des profils d'expression dynamiques et tissus-spécifiques : dans la queue (Figure 4.2), l'expression de GR suit le profil de concentration des GCs; l'intestin et le cerveau montrent une quantité de transcrits constante au cours de la pro-métamorphose, mais une légère diminution

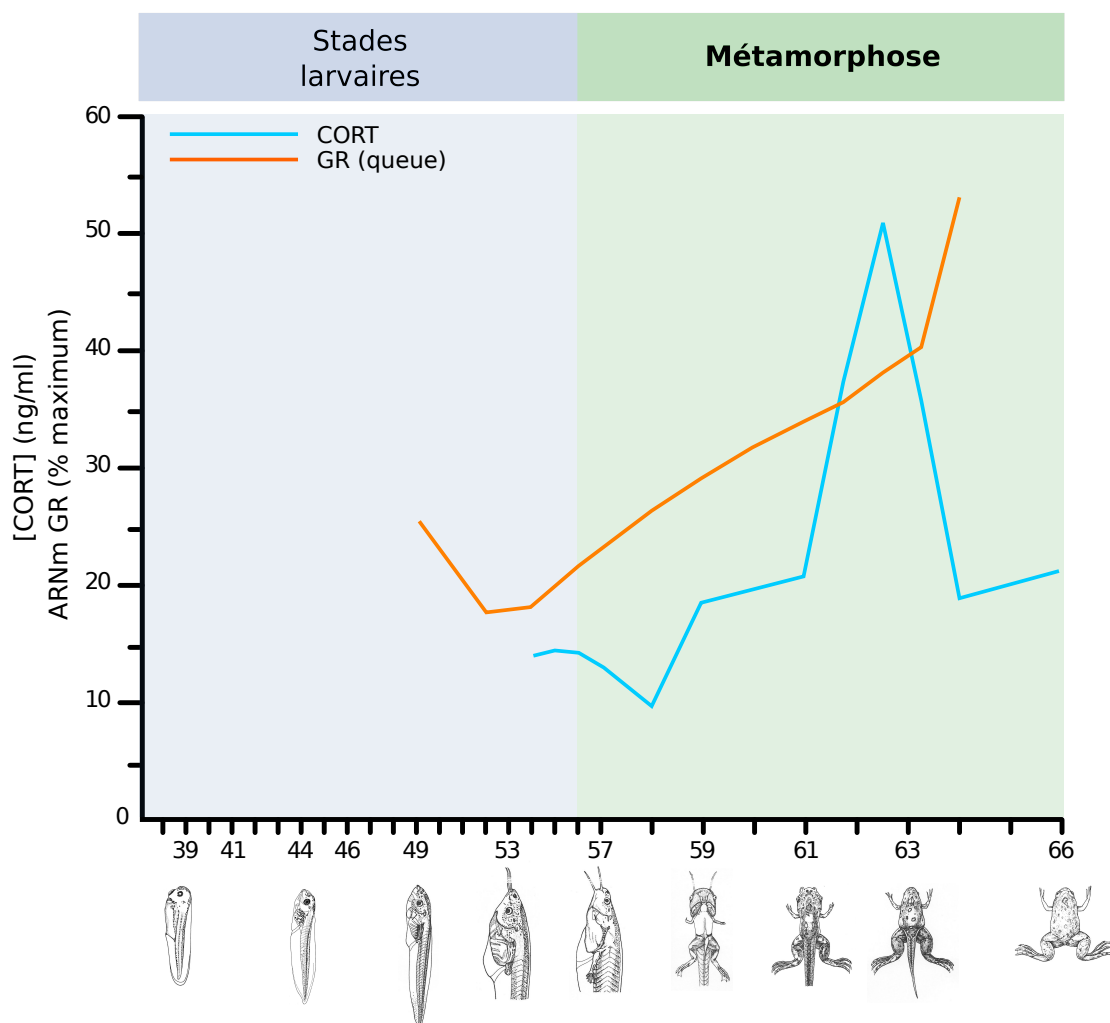


FIGURE 4.2 – Niveaux de corticostérone circulant et abondance des récepteurs aux glucocorticoïdes au cours de la métamorphose. La quantité relative de CORT augmente jusqu'à atteindre un pic au stade NF 62. Concomitamment, dans la queue en cours de résorption, la quantité de transcrits de GR augmente également. Quantification de la CORT tirée de Jolivet Jaudet et Leloup Hatey (1984). Quantification de GR dans la queue tirée de Krain et Denver (2004)

et augmentation respectivement durant le climax (Krain et Denver, 2004).

4.3.3 Rôles dans les interactions avec l'environnement

Les GCs, via leurs effets stade-dépendant et leur implication dans la réponse au stress, peuvent moduler le développement chez la plupart des amphibiens Anoures en fonction des conditions environnementales (Denver, 2009). De façon intéressante, le Xénope, une espèce quasiment exclusivement aquatique, est marginalement affecté au niveau de son développement par un stress. Malgré des mécanismes d'action conservés, le type de réponse à un stress naturel peut donc être très variable, et imputable à des dynamiques de concentration en GCs différentes, ou à des spécificités de régulation des axes HPA et HPT. Chez d'autres espèces d'Anoures au mode de vie particulièrement spécifique et adapté à des conditions arides, les GCs ont une action beaucoup plus spectaculaire sur l'initiation et la rapidité de déroulement de la métamorphose (Kulkarni *et al.*, 2011; Gomez-Mestre *et al.*, 2013). L'exposition à des agents stressseurs de type prédateur peut également provoquer des modifications anatomiques, notamment au niveau de la queue (Middlemis Maher *et al.*, 2013). L'augmentation de la taille de la queue présente l'avantage d'apporter à l'animal une mobilité supérieure consécutive à la présence d'une musculature plus développée. Cette augmentation peut aussi changer l'intérêt du prédateur pour une proie qui ne sera peut-être plus accessible à cause de sa taille. Ces effets sont les conséquences de la signalisation GC. Ils sont l'expression macroscopique des effets de réseaux de régulation conservés au cours de l'évolution. Chez *X. laevis*, d'autres types de stress (agitation, prédateurs, stress prolongés, ponctuels ou chroniques) induisent des phénotypes adaptés. Le Xénope est donc aussi un modèle pertinent dans l'étude du stress sur la métamorphose car au niveau tissulaire et de façon indépendante des régulations centrales, les GCs restent capables d'agir au niveau moléculaire en inhibant l'axe HPA, et en régulant la transcription de gènes caractéristiques de cette transition développementale (Hu *et al.*, 2008; Bonett *et al.*, 2010).

4.3.4 Rôle du système immunitaire

Durant la métamorphose, la quasi-totalité des tissus larvaires sont remodelés et requièrent la résorption et la disparition d'un certain nombre de types cellulaires. Même le développement de tissus et d'organes adultes tels que les membres font appel à des processus d'apoptose afin d'assurer la mise en place des digitations. Quasiment tous les tissus subissent donc des événements de mort cellulaire programmée, impliquent des réactions d'inflammation, et nécessitent l'activation du système immunitaire. En outre, durant la métamorphose, les têtards acquièrent un panel de nouvelles molécules spécifiques de la grenouille adulte (hémoglobine, kératine, vitellogénine et enzymes du cycle de l'urée), auxquelles il doivent devenir immunologiquement tolérants. Dans ce contexte, les GCs sont importants durant cette transition afin de contrôler le système immunitaire, en particulier le renouvellement des populations de lymphocytes et de thymocytes larvaires qui sont en grande partie éliminés par apoptose et remplacés par des équivalents adultes (Rollins-Smith *et al.*, 1997; Schreiber, 2011).

4.4 Interactions croisées entre les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes durant la métamorphose

4.4.1 Interactions croisées au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien

Bien que les HTs soient le signal déclencheur de la métamorphose et soient requises tout au long de ce processus, elles n'agissent pas seules et leurs actions croisent celles d'autres hormones. Les HTs sont en effet capables d'interagir avec la signalisation GC, aussi bien au niveau central (Figure 4.3) que périphérique. Alors que chez la grenouille adulte l'axe HPT correspond à la description donnée au sous-sous-section 1.2.3.1, chez le têtard, la synthèse de TSH par l'anté-hypophyse est sous le contrôle de la CRH (Denver, 1993). Ce rôle double de la CRH permet

au têtard de moduler la vitesse de la métamorphose en réponse à des stimuli environnementaux (Denver, 1997, 2009).

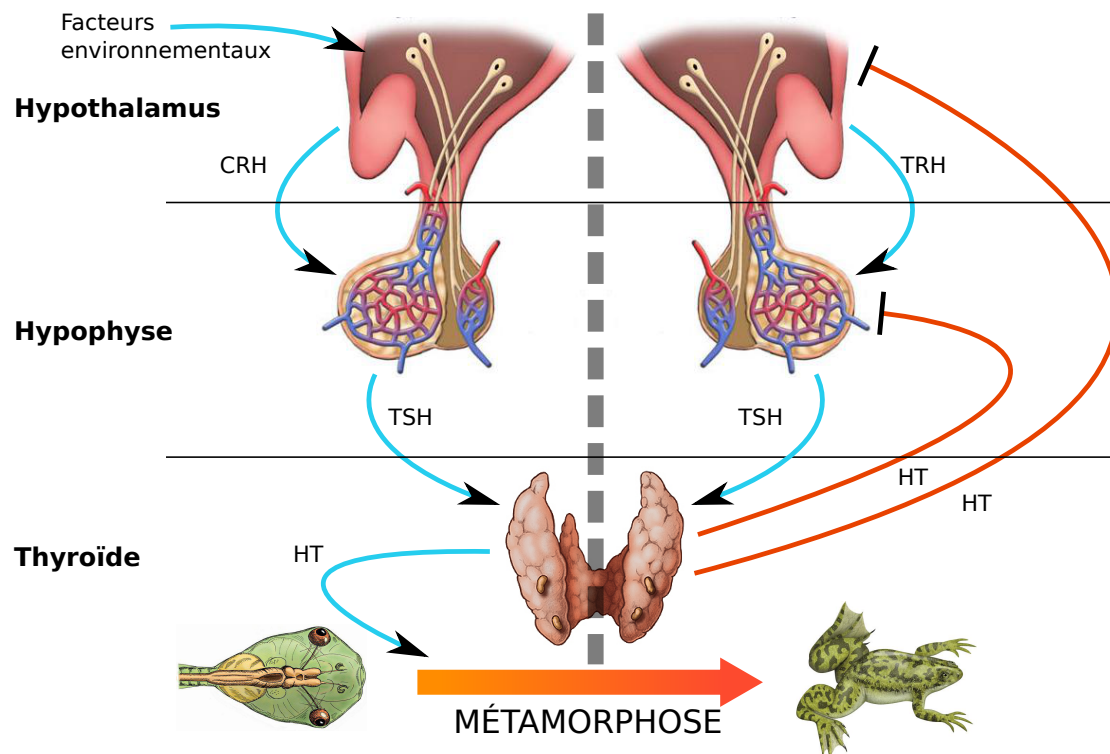


FIGURE 4.3 – Régulations de l’axe HPT durant la métamorphose. Chez le têtard, c’est la CRH qui stimule l’hypophyse antérieure à produire la TSH. Les HTs ainsi synthétisées n’exercent quasiment pas de rétrocontrôle négatif, permettant ainsi à leur concentration d’augmenter au cours de la métamorphose. Après la métamorphose, les HTs exercent le rétrocontrôle négatif classique sur la synthèse de TRH et TSH (voir sous-sous-section 1.2.3.1).

4.4.2 Effets du stress sur la métamorphose HT-dépendante

Durant la période larvaire, le système de la réponse au stress est étroitement imbriqué avec celui de la métamorphose HT-dépendante. Il a été observé très tôt et chez différentes espèces d’amphibiens que la métamorphose était retardée ou accélérée selon le moment où les têtards étaient exposés à un stress ou à des GCs (pré- et pro-métamorphose respectivement) (Kobayashi, 1958; Kikuyama *et al.*, 1983). Si de façon générale, les GCs inhibent la croissance, leur action sur la métamorphose semble en grande partie due à leurs interactions avec les HTs. En effet, les GCs sont capables (à eux seuls) de déclencher la métamorphose chez une seule espèce (*Buffo boreas*, Hayes *et al.*, 1993). Cette action surprenante est probablement due à

des niveaux d'HTs endogènes avec lesquels les GCs sont capables d'agir en synergie, mais insuffisants, à eux seuls, pour induire la métamorphose.

4.4.3 Effets sur les désiodases

Les GCs sont connus pour favoriser l'expression des désiodases activantes et réprimer l'expression des désiodases inactivantes, contribuant à l'accumulation d'HTs actives au sein des tissus cibles. Ce modèle a longtemps été à la base de l'explication de l'effet potentiateur des GCs sur la métamorphose HT-dépendante (Galton, 1990).

4.4.4 Régulation croisée de l'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux glucocorticoïdes

À l'exception de leurs effets non-génomique, ces deux hormones nécessitent leurs RNs respectifs. Dans les tissus périphériques, les GCs agissent en synergie avec les HTs notamment via la régulation croisée au niveau de leurs RNs.

Les GCs sont capables d'augmenter la capacité de liaison de la T_3 dans le noyau (Kikuyama *et al.*, 1983) et la quantité de transcrits de $TR\beta$ dans la queue, le cerveau et les intestins (Bonett *et al.*, 2010). Réciproquement, l'expression de GR semble être en partie contrôlée par les HTs selon les tissus observés : alors que dans le cerveau et les intestins, un traitement à la T_3 induit une diminution de l'expression de GRs, l'opposé se passe dans la queue (Krain et Denver, 2004). Ces résultats suggèrent non seulement que les GCs sont capables d'augmenter la sensibilité aux HTs de certain tissu, accélérant ainsi les processus de métamorphose, mais également que la métamorphose, via l'augmentation des HTs circulantes, induit une réponse stéréotypée au niveau de la sensibilité des différents tissus aux GCs.

4.4.5 Interactions croisées au niveau d'éléments *cis*-régulateurs

Un autre niveau de régulations croisées entre hormones passe par les éléments régulateurs qui affectent leurs gènes cibles. Les régions régulatrices de certains

gènes peuvent en effet présenter des GREs et des TREs, les rendant capables de répondre aux HTs et aux GCs, avec la possibilité de synergie locale entre ces deux hormones. Le gène le mieux caractérisé correspondant à ce cas de figure est KLF9. Chez l’amphibien, son expression est modulée par un stress ou l’administration de GCs exogènes (Bonett *et al.*, 2009), et présente une forte expression durant le climax de la métamorphose, de façon concomitante avec le pic d’HTs (Das *et al.*, 2009). Malgré sa forte expression dans le cerveau, ce facteur de transcription est exprimé dans la majorité des tissus ; de par son profil d’expression temporel au cours du développement post-embryonnaire, le produit de ce gène semble avoir un rôle important d’intermédiaire des effets des HTs sur les structures neuronales et leurs fonctions (Denver *et al.*, 1999; Cayrou *et al.*, 2002). Le contrôle de son expression par les GCs s’effectue via un GRE présent en amont de son promoteur (Bagamasbad *et al.*, 2012). De façon intéressante, ce GRE est conservé chez les vertébrés. Des études moléculaires ont pu précédemment mettre en évidence chez *X. tropicalis* la présence de trois TREs en amont du promoteur (Furlow et Kanamori, 2002 ; données de l’équipe non publiées), dont le plus proximal est proche du GREs préalablement décrit, suggérant que ce locus soit composite. Ceci confère la capacité à ce gène d’être induit par les HT et les GCs d’une manière au moins additive, si ce n’est synergique (Bonett *et al.*, 2010).

4.5 Utilisation en tant que modèle biologique

4.5.1 Effet des hormones thyroïdiennes à la période post-embryonnaire

Chez la majorité des métazoaires, le développement embryonnaires et le stade adulte sont séparés par une période larvaire (Laudet, 2011; Holstein et Laudet, 2014). La métamorphose est le processus par lequel l’organisme acquiert des caractères adultes, délaissant son style de vie larvaire. Chez les amniotes, une telle transition écologique n’est pas morphologiquement aussi marquée. Pourtant, la parturition exige du fœtus qu’il acquière un certain nombre de fonctions absentes durant la gestation. En particulier, chez l’humain, les dernières semaines de grossesse sont

caractérisées par la maturation des poumons, du système nerveux, du squelette et du système digestif. Ces changements s'accompagnent, aussi bien chez l'amphibien en cours de métamorphose que chez le nouveau né, d'évènements endocriniens restreints dans le temps, et requis dans le remodelage des tissus. Notamment, le pic d'HTs nécessaire au déclenchement de la métamorphose et observé durant le climax entre les stades NF 62 et 64, a lieu également autour de la naissance. Il devient ainsi possible de tracer un parallèle étroit entre la biologie de la période périnatale chez les mammifères et la biologie de la métamorphose chez les amphibiens sur la base d'une période marquée par la signalisation thyroïdienne (Laudet, 2011). Ceci justifie ainsi pleinement l'utilisation de la métamorphose comme modèle d'étude de l'action post-embryonnaire des hormones thyroïdiennes lors de la période périnatale.

4.5.2 *Xenopus tropicalis*, un modèle de génomique fonctionnelle

Le modèle amphibien a depuis longtemps été un modèle de choix dans l'étude du développement chez les vertébrés, en particulier par l'utilisation du Xénope (Harland et Grainger, 2011). Essentiellement deux espèces du genre *Xenopus* sont utilisées à des fins de recherche.

4.5.2.1 *Xenopus laevis*

La première, *X. laevis*, bénéficie d'une utilisation historique dans les cliniques et hôpitaux où cette espèce était utilisée comme test de grossesse. Dans son habitat naturel, géographiquement localisé aux régions sub-sahariennes de l'Afrique, *X. laevis* est un animal charognard et se nourrissant de tout débris organique d'origine animale à sa portée. Ce comportement alimentaire confère au Xénope une adaptabilité remarquable concernant son régime, et en fait une espèce aisée à élever en animalerie. *X. laevis* a été très utilisé durant le 20^{ème} siècle, notamment en biochimie, physiologie. De plus, les extraits d'œufs sont un matériel de choix dans le cadre d'expériences *in vitro* principalement pour l'étude de la division cellulaire et du cytosquelette. L'oocyte est aussi un modèle *in vivo* couramment utilisé pour l'étude des canaux ioniques. La connaissance actuelle sur l'embryogenèse et l'organogenèse

des vertébrés a fortement bénéficié des travaux réalisés sur la première phase de développement de *X. laevis*. Enfin, il est à noter que les premiers travaux de reprogrammation cellulaire ont été effectués sur ce modèle et ont été récompensés par le prix Nobel de Médecine en 2012 (Gurdon, 2012a ; 2012b). Toutefois, à la fin du 20^{ème} siècle et au début du 21^{ème}, sa pertinence a été affectée par la difficulté de l'utiliser dans le domaine de la génétique. En effet, bien que son karyotype révèle la présence de 18 paires de chromosomes et suggère une diploïdie, des études ultérieures ont montré qu'un événement de duplication du génome a eu lieu avant la divergence de *X. laevis*. Ceci suggère que *X. laevis* soit une espèce pseudo-tétraploïde, la redondance au moins partielle entre deux sets de chromosomes rendant ce modèle incommode pour l'étude de phénomènes génétiques. De plus, l'aire de la génomique n'a pas pu être envisagé rapidement pour cause de ce génome pseudo-tétraploïde, les technologies de séquençage et d'assemblage n'étant pas adaptées. Toutefois, avec l'essor des NGS (nouvelle technologie de séquençage, "next-generation sequencing") a permis de générer un premier assemblage (<http://www.xenbase.org>) qui n'est pas encore pertinent pour des études dans un contexte de génomique fonctionnelle (assemblage morcelé et annotation partielle).

4.5.2.2 *Xenopus tropicalis*

La seconde, *X. tropicalis*, présente la plupart des avantages de *X. laevis*, notamment sa facilité d'élevage et la taille importante de ses embryons. Toutefois, *X. tropicalis* est la seule espèce parmi les 20 espèces du genre *Xenopus* à être diploïde, ce qui en fait un modèle particulièrement pertinent en génétique et en génomique fonctionnelle (Amaya, 2005). En outre, c'est la première espèce d'amphibien dont le génome a été séquencé. Un assemblage a été récemment publié (Hellsten *et al.*, 2010), mais souffre malheureusement d'un manque de ressources évident comparé à des organismes modèles plus populaires comme la souris ou la drosophile (pour revue, voir Grimaldi *et al.* (2013) ; Annexe A- 2). *X. tropicalis* reste un modèle particulièrement pertinent en génomique fonctionnelle et en endocrinologie, en particulier pour l'étude de la métamorphose et des mécanismes moléculaires sous-jacent.

Compte tenu de la pertinence du modèle amphibien pour l'étude de la

physiologie de la période post-embryonnaire fortement marquée par la signalisation thyroïdiennes et de la nécessité de ressources en génomique, *X. tropicalis* représente le modèle de choix pour lequel nous avons opté de façon à mener ces travaux.

4.5.3 Amélioration de l'assemblage et de l'annotation du génome de *X. tropicalis*

Comme indiqué précédemment, le modèle *X. tropicalis* souffre tout de même et malheureusement d'un manque de ressources permettant d'améliorer non seulement l'assemblage de son génome et mais également son annotation (Gilchrist et Pollet, 2012). Au cours de mon doctorat, j'ai participé aux efforts conduits par l'équipe d'accueil pour diminuer la fragmentation du génome et pour apporter une annotation pertinente pour la réalisation d'études de génomique fonctionnelle (Grimaldi *et al.*, 2013; Annexe A- 2). Ces efforts ont été particulièrement importants dans l'exploitation des données de ChIA-PET (analyse des interactions de la chromatine par séquençage de tags appariés, "chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing") (Annexe A- 3) et dans une moindre mesure des résultats présentés dans ce manuscrit. Cependant, ces travaux m'ont permis de me familiariser avec ce génome et les outils bioinformatiques qu'il convient d'adapter pour son étude.

En particulier, l'utilisation du gPET (séquençage de tags appariés d'ADN génomique, "genomic DNA pair-end tag sequencing") permet de réduire la fragmentation de l'assemblage actuel de 60 % en reconstruisant des chaînes de scaffolds. L'assemblage utilisé (version 4.1) présente de nombreux trous d'assemblages (Figure 10.1 de la revue Grimaldi *et al.*, 2013; Annexe A- 2). Curieusement, près de la moitié des trous d'assemblage font exactement 50 pb, et correspondent à des trous de taille inconnue. Dans ce contexte, j'ai réutilisé les données de gPET afin de réévaluer ces trous d'assemblage à une taille moyenne d'environ 500 pb, correspondant à près de 15 Mpb (méga paire de bases) supplémentaires (Annexe A- 3, section "Large insert DNA-PET significantly reduced complexity of genome assembly", premier paragraphe et Figures supplémentaires 3 à 7). Bien que le contenu en séquence connue des ces trous soit inchangé, l'estimation de leur taille réelle se révèle être une ressource précieuse, non-seulement pour

l'analyse des données de NGS produites par l'équipe, mais également dans le cadre d'expériences de biologie humide en proposant une image plus réelle de la lecture linéaire que nous pouvons avoir de la séquence du génome.

Dans un second temps, les modèles de gènes ont été reconstruits grâce à l'utilisation combinée de la technologie de RNA-Seq (séquençage des ARN, "RNA sequencing") et de RNA-PET (sequençage de tags appariés d'ARN pleine longueur, "paired-end tags sequencing of full length RNA"). Une façon de valider les nouveaux modèles de gènes est de caractériser le positionnement de l'ARN-Pol-II au niveau de leur partie 5'. En effet, de façon surprenante, l'ARN-Pol-II tend à s'accumuler fortement à l'extrémité 5' des gènes transcrits (et certains non transcrits activement), avec une densité maximale 25 à 50 pb en aval du TSS. J'ai donc effectué un ChIP-Seq (séquençage massif des produits d'immunoprécipitation de chromatine, "deep sequencing of chromatin immunoprecipitation products") dirigé contre ARN-Pol-II. Les profils d'occupation de ARN-Pol-II montrent bien un enrichissement 30 à 50 pb en aval du TSS, ce qui n'est pas le cas pour une majorité des modèles de gènes publiés (Annexe A- 3, section "Genome re-annotation with RNA-PET and RNA-Seq", huitième paragraphe, Figures 4 et 5, Figure supplémentaire 27). Ces résultats confirment fortement la qualité des nouveaux modèles de gènes.

Stratégies et Démarches Expérimentales

Les tissus ont été traités dans différentes conditions et les ARN extraits (Figure 5.1 vert). La mesure du niveau d'expression des transcrits a ensuite été fortement parallélisée, à l'aide des techniques modernes de séquençage massif (Figure 5.1 cyan). Les séquences brutes ont été nettoyées et ont subi tout un ensemble de contrôles qualité, avant d'être associées à leur gène cible (Figure 5.1 orange). Tout au long de cette trame, des contrôles qualités sont menés pour valider la qualité des échantillons biologiques et de la mesure effectuée par séquençage (Figure 5.1 violet). Les mesures digitales d'expression des gènes ainsi obtenues ont permis de déterminer les gènes différentiellement exprimés, de dériver des profils d'expression ("clustering") et d'isoler les gènes soumis à une régulation spécifique des co-traitement HT - GC. La fouille ultérieure des données (étape communément appelée "intégration des données") a permis de traduire les listes de gènes différentiellement exprimés en processus biologiques affectés par les interactions croisées en HTs et GCs. La trame générale des principales étapes méritant une attention particulière est présentée Figure 5.1.

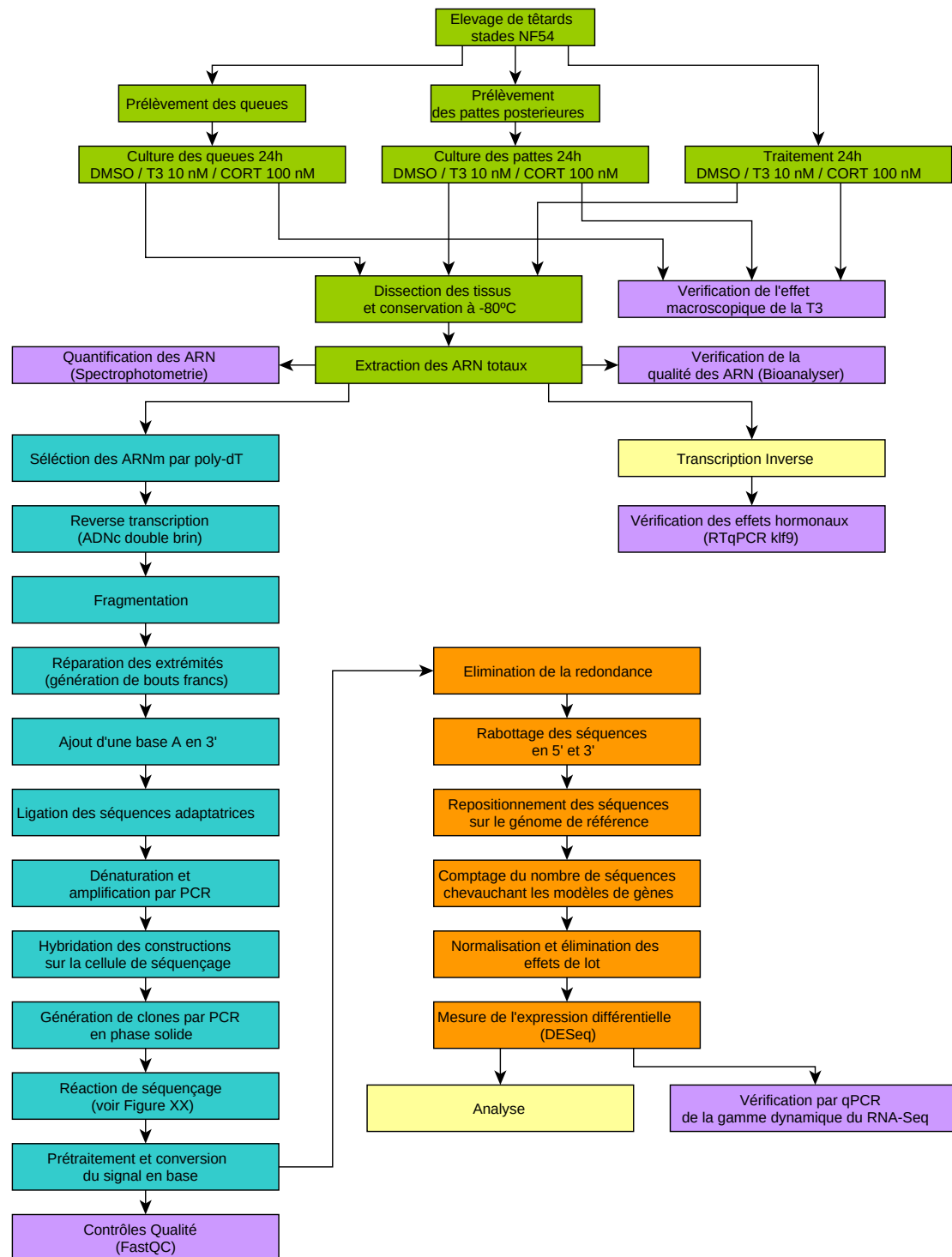


FIGURE 5.1 – Diagramme de la démarche expérimentale. Vert : Préparation et collection des échantillons biologiques. Cyan : Préparation des banques et séquençage. Orange : Traitement des données. Violet : Contrôles et vérifications.

5.1 Collection des échantillons biologiques

5.1.1 Choix des tissus

Nous avons choisi deux tissus au devenir cellulaire différent : le TF (épiderme caudal, “tailfin”), qui est résorbé à la fin de la métamorphose, et les HLBs (bourgeons de membres postérieurs, “hindlimb buds”) qui se développent sous l’action des HTs. Ces tissus sont d’autant plus pertinents qu’ils répondent aux HTs *ex vivo*, et que, dans le cas du TF, le co-traitement avec HTs et GCs accélère sa régression. Techniquement, j’ai réalisé des cultures organotypiques, qui sont un modèle d’étude classique de la métamorphose car elles récapitulent la régression du TF, indépendamment de toute régulation centrale (Kikuyama *et al.*, 1982, 1983; Galton, 1990). Le développement *ex vivo* des pattes sous l’effet de la T_3 a déjà été décrit (Tata *et al.*, 1991), mais ces résultats n’ont pas été reproduits au laboratoire. En outre, l’analyse à grande échelle des effets sur l’expression de gènes cibles des HTs dans les bourgeons de queue en développement n’ont pour le moment été abordés que chez *X. laevis*, et par puce à ADN (Buckbinder et Brown, 1992).

Actuellement, les seules analyses à grande échelle des effets des HTs durant la métamorphose portent sur la régression de la queue, utilisée dans son entier (Wang et Brown, 1993; Helbing *et al.*, 2003; Kulkarni et Buchholz, 2012). Nous avons choisi de nous restreindre au TF car la diversité des types cellulaires s’en retrouve plus limitée, et qu’il s’agit d’un des premiers tissus à répondre au signal hormonal.

Les expériences menées sur les cultures organotypiques ont été complétées par des expériences similaires conduites sur des têtards entiers et ayant subi les mêmes traitements hormonaux (voir section suivante). Ceci a pour objectif de découpler les effets des hormones propres au tissu d’intérêt des effets centraux et des artefacts liés aux conditions de cultures.

5.1.2 Traitements hormonaux

5.1.2.1 Hormones thyroïdiennes

Les HTs utilisées dans le cadre de ces travaux sont la T_3 , car c'est principalement elle qui est directement active sur les tissus cibles. Une concentration finale (aussi bien en culture organotypique que chez les têtards entiers) de 10 nM de T_3 a été utilisée car elle représente une quantité d'hormone proche de la concentration physiologique au moment du climax rapportée chez *X. laevis* (Leloup et Buscaglia, 1977).

5.1.2.2 Glucocorticoïdes

Chez les amphibiens, la CORT est le GC naturellement produit lors d'un stress. Nous avons donc utilisé cette hormone à une concentration finale de 100 nM, reproduisant ainsi la quantité physiologique détectée en cas de stress naturel (Jolivet Jaudet et Leloup Hatey, 1984; Krain et Denver, 2004).

5.1.2.3 Temps de traitement

Les traitements hormonaux sur les cultures organotypiques et les têtards entiers ont été effectués pendant 24 h avant la récupération des tissus. Cette fenêtre de temps est classiquement utilisée dans la littérature, facilitant la comparaison des résultats obtenus, et permet d'observer les premières réponses moléculaires aux traitements hormonaux. Pour tous les traitements hormonaux, soit un explant de queue, soit un têtard ont été laissés dans le bain de traitement pendant plusieurs jours afin de s'assurer des effets macroscopiques des traitements réalisés.

5.1.3 Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits tels que décrit dans Bilesimo *et al.* (2011). Ceux-ci ont systématiquement été quantifiés par spectrophotométrie afin de s'assurer que suffisamment de matériel a été récupéré pour permettre la synthèse de banques et le séquençage. L'absence de dégradation a également été vérifiée par électrophorèse capillaire en utilisant le "Bioanalyzer" (Agilent). En outre, une reverse transcription

et une RT-qPCR (réaction en chaîne de polymérase quantitative et en temps réel, “real time quantitative polymerase chain reaction”) sur le gène KLF9 ont été systématiquement réalisées afin de s’assurer de l’effet moléculaire des deux traitements hormonaux. Une fois collectés, les ARN ont été envoyés pour séquençage massif à la plateforme de génomique de l’ENS de Paris.

5.2 Séquençage à haut débit des transcrits

5.2.1 Principe et justification

La partie principale du projet porte sur l’évaluation à l’échelle du transcriptome des interactions croisées entre HTs et GCs. Les premières techniques permettant la mesure de la quantité de transcrits à grande échelle sont les puces à ADN. Leur essor a été déterminant au cours de la dernière décennie et a révolutionné notre perception de l’activité cellulaire. Elles souffrent néanmoins d’un certain nombre de défauts, en particulier le fait qu’elles n’autorisent la mesure que de gènes déjà caractérisés *a minima*, que la qualité de la mesure dépend grandement de la qualité de la puce en elle même, et que l’étendue dynamique est plutôt réduite. Bien que cette technologie ait été centrale dans l’étude de réseaux de régulation chez des espèces modèles telles que l’humain, la souris ou la drosophile, les puces spécifiques de *X. tropicalis* restent incomplètes. Nous avons par conséquent choisi d’utiliser une technologie de séquençage massif des ARN, le RNA-Seq. Cette technique présente l’avantage d’être naïve dans le sens où la mesure des niveaux de transcrits est indépendante d’une connaissance *a priori* de leur structure. En effet, comme présenté précédemment, le RNA-Seq peut bénéficier de l’évolution et de l’amélioration constante de l’annotation et de l’assemblage des génomes, alors que la détection de nouveaux transcrits par puce à ADN nécessiterait le dessin d’une nouvelle puce. De plus, l’étendue dynamique des mesures est beaucoup plus grande que pour les puces à ADN (Grimaldi *et al.*, 2013 ; section A- 2). Les technologies basées sur le séquençage massif ont un autre avantage, plus subtil, vis à vis des technologies basées sur l’hybridation sur puces à ADN d’acides nucléiques marqués par des fluorophores couplés à une mesure de fluorescence. L’hybridation

moléculaire de fragments d'acides nucléiques est difficile à standardiser et est très sensible aux (faibles) variations expérimentales. Elle dépend aussi d'un grand nombre de facteurs physico-chimiques liés à la composition des séquences ou à la qualité de la puce, qui affectent directement la qualité de la mesure. Il en résulte que la mesure de fluorescence, c'est à dire notre mesure indirecte de la quantité du transcrit correspondant, est fondamentalement bruitée. Les outils de traitement des données de puces à ADN essaient de modéliser ces biais afin de les corriger dans une certaine limite. A l'inverse, pour le RNA-Seq, et c'est l'une de ses forces, "l'hybridation" a lieu *in silico* (étape de "positionnement sur le génome", voir ci-dessous) et offre un bien meilleur contrôle : elle peut par exemple être réalisée à des niveaux de stringence différents afin de caractériser une ou plusieurs composantes de bruit et mieux contrôler la résolution des mesures.

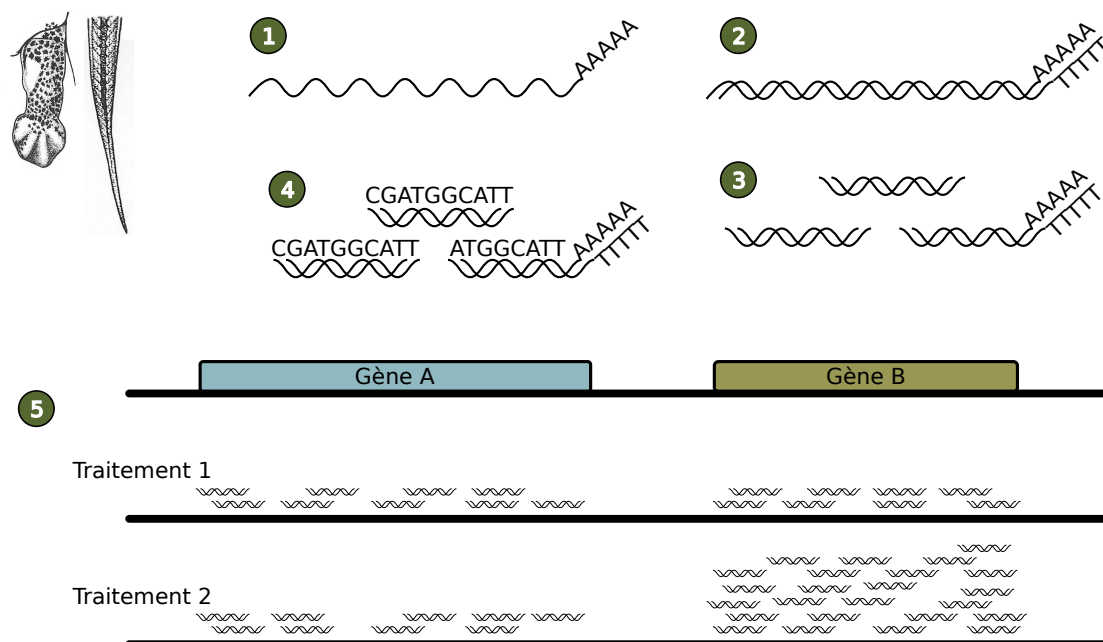


FIGURE 5.2 – Principe du RNA-Seq. 1) Les ARN totaux sont extraits des tissus (ici queue et bourgeon de membres postérieurs) et sélectionnés sur colonne poly-T. 2) Des ADNc (ADN complémentaires) sont synthétisés à partir des ARN, 3) et fragmentés. Après séquençage 4) (dans le cadre de ce projet en chimie TruSeq), les "reads" sont repositionnés sur le génome, et comptés dans les modèles de gènes connus 5) afin d'en inférer l'expression différentielle.

Le principe de base du RNA-Seq reste fondamentalement simple, et consiste à séquencer des fragments de ADNc synthétisés après extraction des ARN et sélection (dans le cas présent) par la queue poly-A. La composition en acides nucléiques

des séquences (“reads”), permet de les repositionner sur le génome. La quantité de “reads” étant proportionnelle à la quantité de transcrits contenant ces séquences, le profil de densité de “read” le long d’un gène renseigne directement sur son niveau d’expression dans la cellule. En utilisant cette technologie pour chaque condition expérimentale, il devient possible d’identifier les gènes différentiellement exprimés dans une condition par rapport à une autre. La Figure 5.2 décrit le principe du RNA-Seq dans le contexte de ce projet.

5.2.2 Implémentation : Construction des banques

Il existe plusieurs implémentations du séquençage des ARN en fonction de la plateforme utilisée et la question posée. Dans le cadre de mes travaux, la construction des librairies et le séquençage en lui même ont été externalisés à l’ENS de Paris. La chimie utilisée est celle proposée par *Illumina* à travers les kits TruSeq. Dans ce protocole, les ARNm sont purifiés par sélection sur la base des queues poly-A, puis fragmentés et convertis en ADNc double brins. La construction des banques à proprement parler débute par la réparation des extrémités des ADNc obtenus à l’étape précédente par phosphorylation et génération de bouts francs en combinant des réactions de réparation de l’ADN (“fill-in”) et d’activité d’exonucléases. Une base “A” est ajoutée à chaque brins en 3’, permettant la ligation ultérieure des adaptateurs possédant un “T” sortant en 3’. Ces adaptateurs sont des ADN double-brin contenant les séquences à la réaction de séquençage (voir plus bas) et les “code-barres” utilisés pour le multiplexage (séquençage de plusieurs banques sur une même ligne et discrimination des “reads” d’origines différentes au moment du traitement des données brutes). Ce protocole très standard, qui permet de séquencer 50 pb d’une des extrémités de chaque fragment d’ADNc sans information de brin (“non-strand specific single end reads”), correspond à l’approche la plus simple à mettre en œuvre pour déterminer de façon robuste le niveau d’expression de gènes. Après dénaturation et amplification des constructions, le produit final peut être séquençé sur plateforme *HiSeq*.

La technologie Illumina repose sur le principe de “séquençage par synthèse”, c’est à dire l’addition séquentielle de nucléotides couplés à des fluorophores, et la mesure de la fluorescence incorporée. Elle nécessite l’hybridation des produits

obtenus à la fin de la construction de la banque par complémentarité avec des amorces spécifiques, complémentaires des adaptateurs, et physiquement attachées à une lame de verre (souvent appelée “flow cell”). Des clones de ADNc physiquement liés à la cellule sont produits par amplification par PCR (réaction en chaîne de polymérase, “polymerase chain reaction”). Les clones font environs 1 μm de diamètre ce qui permet à la fluorescence d’être détectée par un dispositif optique. La densité des clones est un paramètre important qui influe à la fois sur la quantité de “reads” obtenus et sur la qualité de la lecture de chaque base. À chaque cycle, l’incorporation d’un seul nucléotide par ADNc fixé à la cellule est détectée par fluorescence. La nécessité de cliver le fluorophore afin de pouvoir incorporer le nucléotide su cycle suivant rend cette chimie robuste dans le cas de séquences homopolymériques.

Le pré-traitement des données brutes consiste à convertir l’intensité de fluorescence de chaque nucléotide en la base correspondante. Les modèles mathématiques qui sous-tendent cette étape prennent en compte le chevauchement des spectres d’émission de façon empirique sur la base des premiers cycles. Par conséquent, il est important que le biais de GC soit le plus petit possible. Le taux d’erreur de lecture augmente progressivement avec le nombre de cycles.

5.2.3 Contrôles qualités

La qualité des séquences récupérées a été vérifiée à l’aide de la suite logicielle “FastQC” (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Cet outil fournit un ensemble de métriques (longueur, score-qualité, nombre de “N” des séquences, proportion de séquences dupliquées...) reflétant la qualité générale de l’ensemble des “reads” et permet de visualiser directement les biais éventuels et les erreurs systématiques, et permet par la suite d’adapter le traitement des données à la qualité des séquences produites.

5.3 Traitement des données

Les séquences brutes ne sont pas directement exploitables car elles ne reflètent pas (encore) le niveau d’expression des gènes. Pour cela, il est nécessaire, dans un premier temps, d’effectuer un ensemble d’opérations purement techniques sur

ces données (filtrage, rabotage, placement sur le génome...), mais qui se révèlent déterminantes pour leur exploitation biologique ultérieure. Ces différentes étapes de traitement du signal ne correspondent pas à l'analyse des séquences à proprement parler.

5.3.1 Élimination de la redondance

Le séquençage massif est une technologie dérivée de la PCR, dont les biais sont susceptibles d'affecter la représentativité des “reads” vis à vis des ADNc séquencés. L'artefact le plus fréquent est la sur-amplification préférentielle de certains “reads”, dont le nombre ne reflète plus l'abondance du transcrit dont ils dérivent. Par conséquent, seuls les “reads” uniques sont conservés. Dans le cas où un “read” est présent en plusieurs copies identiques, seul celui avec le meilleur score est conservé.

5.3.2 Rabotage des séquences (“trimming”)

Compte tenu des informations obtenues lors des contrôles qualité, il a été nécessaire d'éliminer 10 bases en 5' des “reads” car elles correspondent souvent aux extrémités des adaptateurs de séquençage. Il est aussi nécessaire d'éliminer une quantité variable de bases à leur extrémité 3', dès que la qualité de lecture de chaque base devient inférieure à un seuil de 30 sur l'échelle PHRED (correspondant à une probabilité d'erreur de 0.1 %). En effet, la qualité de chaque mesure tend à diminuer progressivement à mesure des cycles de séquençage. Ces deux étapes de rabotage sont très courantes et font partie du processus normal de traitement des données brutes. Il est à noter que cette étape a pu être réalisée après élimination de la redondance, ce qui reflète la très bonne qualité des séquences obtenues (dans le cas contraire, les erreurs de séquences auraient empêché l'élimination correcte de la redondance).

5.3.3 Positionnement des séquences sur le génome

L'utilisation des séquences brutes pour inférer le niveaux d'expression des gènes nécessite d'associer les “reads” à des modèles de gènes prédéfinis. Pour cela, chaque “read” est replacé sur le génome de référence (étape de “mapping”) à l'aide

du logiciel Bowtie v0.12.7 (Langmead *et al.*, 2009). Les paramètres utilisés, qui dépendent fortement de la qualité des “reads” et peuvent donc être très variables d’une expérience à l’autre, sont les suivants : -m=1 (Ne garder que les “reads” positionnés à une seule position) -5=10 (“trimming” de 10 bases en 5’, voir sous-section précédente) -l=26 (longueur de graine de 26 bases) -n=1 (autoriser une seule discordance entre la graine et la séquence de référence). Les résultats produits par Bowtie sont ensuite transformés en un format plus générique (format BED) afin de faciliter les étapes ultérieures. À noter, il n’a pas été possible d’utiliser un autre format très standard, le format BAM, qui présente l’énorme avantage d’être compressé (et donc permet de réduire les contraintes de stockage) et indexé, ce qui améliore considérablement les temps de calcul et simplifie beaucoup les étapes suivantes. En effet, l’assemblage du génome de *X. tropicalis* est composé d’environ 20 000 scaffolds alors que le format BAM ne peut en accommoder qu’une centaine. Ce type de complication est malheureusement très courant dans les approches génomiques des modèles non conventionnels, ce qui entrave fortement le traitement et l’analyse des données. Ces outils bioinformatiques sont, en général, très performants pour des modèles courants (souris, humain, drosophile...). Le nombre de “reads” localisé entre les bornes de chaque gène correspond alors à la mesure brute de son niveau d’expression. Il faut noter que les “reads” peuvent être orientés sur chaque brin, quelle que soit l’orientation du gène. C’est une conséquence normale du protocole de RNA-Seq utilisé (voir ci-dessus). De plus, les régions où deux gènes se chevauchent sont exclues de l’analyse car il devient alors impossible de déterminer de quel gène les “reads” sont issus.

5.3.4 Débruitage et normalisation des données

En raison de contraintes logistiques, les ARN des différentes répliques biologiques et les différents tissus n’ont pas été séquencés au même moment. Entre temps, la plateforme de l’ENS a changé de kit de séquençage (TruSeq v1 à TruSeq v2), ce qui a introduit des biais importants dans la mesure du signal, rendant la comparaison des résultats et l’utilisation des répliques biologiques plus difficiles. Les sources de variabilité associées à chaque set de données ont été caractérisées par ACP (analyse en composantes principales) et la composante principale strictement associée à des

effets de lot a été éliminée. Cette méthode de réduction du bruit technologique est utilisée dans le cadre de la comparaison de résultats de puces à ADN issus de plateformes différentes.

Les mesures brutes du niveau d’expression des gènes dépendent de plusieurs paramètres. Outre le niveau réel d’expression des gènes, ces valeurs dépendent aussi de plusieurs facteurs, dont les deux principaux sont :

- La profondeur de séquençage, c’est à dire le nombre total de “reads” uniques replacés sur le génome, pour chaque réplique biologique. Plus il y a de “reads”, plus cette valeur est élevée, à niveau d’expression équivalent. Corriger les valeurs brutes d’expression des gènes en les multipliant par un facteur correctif pour les rapporter à un nombre total de “reads” équivalent serait a priori une approche satisfaisante. Il semble cependant que ce ne soit pas le cas et qu’un sous ensemble de quelques gènes différentiellement et fortement exprimés puisse l’affecter énormément. La profondeur de séquence est donc normalisée par une approche légèrement différente, moins sensible aux extrêmes, et basée sur le calcul de la médiane des rapports d’expression brutes des gènes (voir détails dans Anders et Huber, 2010).
- La taille du transcrit. Plus ce dernier est grand, plus il capturera de “reads” comparé à un transcrit plus petit, à niveau d’expression équivalent. Ce biais ne s’applique pas dans le cadre de mon travail, qui ne se base pas sur des mesures absolues du niveau d’expression des gènes. Leurs niveaux d’expression après chaque traitement est exprimé relativement à celui de la condition contrôle.

5.3.5 Mesure de l’expression différentielle des gènes

Le travail de traitement des données du RNA-Seq se conclut sur la mesure de l’expression différentielle des gènes. Avant d’utiliser un outil faisant appel à un modèle statistique pour déterminer les gènes différentiellement exprimés, les gènes très faiblement exprimés dans l’ensemble des traitements et n’ayant aucune chance de passer les seuils statistiques ultérieurs sont retirés du jeu de donnée. Cette étape de “filtre indépendant” (de tout test statistique) permet de gagner en puissance statistique et est classiquement appliquée au cours de l’analyse de données de

puces à ADN ou de RNA-Seq. Pour cela, j’ai utilisé le paquet R “DESeq” (Anders et Huber, 2010) qui base sa méthode de détection des gènes différentiellement exprimés sur la modélisation des nombres de “reads” associés à chaque modèle de gènes par une distribution binomiale inversée. Cette dernière présente l’avantage de mieux modéliser la distribution du nombre de “reads” par rapport à une loi de Poisson, en particulier pour les gènes associés à un nombre moyen à faible de “reads”. L’utilisation de cette méthode fait partie des standards actuels de l’analyse de données de NGS (Anders *et al.*, 2013). Les contrastes utilisés correspondent à ceux définis entre la condition “contrôle” et ceux issus des trois traitements hormonaux.

5.4 Analyse des données

5.4.1 Annotation fonctionnelle automatisée

L’annotation fonctionnelle de sets de gènes a été dans un premier temps effectuée de façon automatisée en se basant sur les liens établis entre gènes et fonctions biologiques dans le cadre de la GO (ontologie de gènes, “gene ontology”). Il est à noter que malgré l’avantage certain qu’offre ce type de méthode concernant la standardisation de l’analyse, l’annotation GO est particulièrement biaisée vers des processus très étudiés.

L’outil en ligne utilisé pour effectuer le test statistique d’enrichissement et la représentation des résultats sous forme de graphe orienté acyclique est GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Cet outil implémente la détermination de termes enrichis en se basant sur une distribution hypergéométrique décrite par trois paramètres : le nombre de gènes total (N), le nombre de gènes associé à un terme GO particulier ($B_{termeGO}$) et le nombre de gènes testés (n). La queue de la distribution permet de déduire la probabilité qu’un certain nombre de gènes parmi la liste testée soient associés au terme GO considéré.

Il est important de préciser que lors d’une analyse d’enrichissement de termes fonctionnels, il est crucial de bien choisir l’ensemble de gènes servant de base et contre lequel l’enrichissement sera estimé (N) (généralement appelé “background”). Ainsi, l’utilisation d’un “background” artificiellement appauvri en gènes participant

à une fonction biologique particulière résultera en un enrichissement apparent de cette fonction biologique quelque soit le set de gènes utilisé. Au contraire, en “background” déjà enrichi en gènes liés à une fonction biologique particulière ne permettra pas sa mise en évidence.

Dans le cadre de l’analyse des résultats présentés dans ce manuscrit, deux usages ont été faits : Le premier utilise comme “background” l’ensemble des gènes exprimés. Ceci permet de mettre en évidence les fonctions biologiques globalement affectées par les traitements hormonaux. Le second utilise comme “background” la liste des gènes différentiellement exprimés dans au moins un traitement. Dans ce cas, le contraste mis en avant est celui de la fonction d’un sous-groupe de gènes différentiellement exprimés par rapport à l’effet global des deux hormones.

5.4.2 Curation manuelle de l’annotation fonctionnelle

Pour aller plus loin dans la caractérisation des rôles biologiques des différentes catégories de profils, j’ai réalisé une curation manuelle des fonctions connues de chaque gènes sur la base des informations disponibles sur les pages “gene” du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), GENECARDS (<http://www.genecards.org/>) et la littérature scientifique. Bien que cette annotation ne prenne pas en compte l’aspect hiérarchique des fonctions biologiques et moléculaires (et se retrouve en conséquence polluée par une certaine redondance), elle a le mérite d’intégrer des informations moins biaisées et plus récentes d’une part ; d’intégrer des liens entre fonctions moléculaires et fonctions biologiques (à plus haut niveau), parfois absents, d’autre part. Ce type d’analyse complémentaire, bien que moins orthodoxe, a déjà été utilisée dans le cadre de travaux publiés (Hendrix *et al.*, 2008) et dans le cas de la dissection de phénomènes biologiques fins, justifie l’exploitabilité des données.

Troisième partie

Résultats

Caractérisation des interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes dans les bourgeons de membres postérieurs

6.1 L'interaction croisée des hormones thyroïdiennes et des glucocorticoïdes dans les pattes postérieures révèle une perturbation des programmes de mise en place du squelette

6.1.1 Résumé et portée de l'article

J'ai dans un premier temps consacré mes efforts à l'analyse des programmes transcriptionnels régulés par les HTs et les GCs dans les bourgeons de membres postérieurs de têtards de *X. tropicalis*. Ces organes sont au stade NF 54 en plein développement, et font intervenir des processus cellulaires très variés, de la prolifération à l'apoptose. Ce modèle d'étude est particulièrement pertinent dans le

cadre des impacts à long terme de perturbations survenant lors du développement post-embryonnaire.

Comme décrit précédemment, l'analyse de la dynamique du transcriptome de cet organe après 24h de traitement aux HTs et/ou aux GCs est réalisée par RNA-Seq. Le détail de la procédure utilisée au cours de cette partie de l'analyse est décrit dans la section "Materials and Methods" de la publication en cours de finition présentée à la sous-section 6.1.1.

Le résultat fort qui découle de ce travail concerne la fonction biologique des gènes dont l'expression induite ou réprimée par une des deux hormones est affectée par la seconde. Les profils d'expression peuvent ainsi être classifiés en deux catégories : "antagonistes" quand l'effet de la première hormone est inhibée par la seconde ; "potentiés" dans le cas d'une additivité ou une synergie d'action entre les deux hormones.

L'analyse préliminaire basée sur l'annotation fonctionnelle de ces gènes par GO révèle que seul un certain type de profil semble enrichi en une fonction biologique particulière (voir paragraphe 6.2.2.2). Pour aller plus loin et se détacher des biais potentiel bien connus des bases de données d'annotation fonctionnelles (meilleure caractérisation dans un contexte mammalien, biais vers certaines fonctions biologiques ...), chaque gène dans les différentes catégories d'interactions croisées entre HT et GC a été annoté manuellement sur la base de la littérature. Il ressort de cette analyse qu'une part significative de ces gènes sont impliqués dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire, du cartilage, et de l'os. Alors qu'il est bien décrit dans la littérature que les HTs et les GCs sont cruciaux lors du développement squelettique (Robson *et al.*, 2002; Wojcicka *et al.*, 2013), ces données apportent les premiers éléments de réponse moléculaires vers une élucidation du rôle et des conséquences développementales de l'interaction croisée entre deux voies de signalisation.

Crosstalk between glucocorticoid and thyroid hormone signaling at post-embryonic transition.

Alexis Grimaldi¹, Nicolas Buisine¹, Corinne Blugeon², Adeline Couvé² and Laurent Sachs^{1*}.

1: UMR7221 CNRS, Museum National d'Histoire Naturelle, 57 Rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.

2: Plateforme Génomique de l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure-IBENS, 46 rue d'Ulm F75230 Paris cedex 05, France.

*: Corresponding author, sachs@mnhn.fr

UMR7221 CNRS, Museum National d'Histoire Naturelle, CP32, 7 Rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.

Keywords : glucocorticoid, thyroid hormone, crosstalk, post-embryonic development

Abstract

Endocrine signaling mediated by nuclear receptors form a set of highly conserved pathway among chordates. Thyroid hormones signaling has a wide range of biological effects involved in the control of homeostasis and development. TH also control the onset of amphibian metamorphosis, which resemble the mammalian perinatal period. Indeed, *Xenopus* metamorphosis has been an instrumental model in building our current understanding of TH signaling during vertebrates development. Glucocorticoids (GC) mediate stress response in a physiological or developmental context. They also act as a relay that channel environmental inputs and modulate the corresponding biological processes. Although deeply adaptative in nature, GC mediated responses may also promote more detrimental long term effects. Similarly, the clinical use of GC is limited by long term adverse effects. Surprisingly, although functional interactions between TH and GC signaling are known, there are supported by little molecular data.

Here, we used extensive analysis of RNA-Seq data to collect the molecular details of the crosstalk between TH and GC signaling during limb development, *in vivo*. We show that the transcriptional response to TH and GC is highly archetypal and that crosstalk affects expression of a restricted number of genes (~ 300), mostly involved in bone formation and resorption or linked to human skeletal pathologies. We also show that GC treated metamorphic tadpoles have a strong phenotype with early ossification of long bones. Thus, our work provide a first molecular landscape of TH and GC crosstalk with potential applications for human health.

Introduction

Adversity early in life is thought to elicit developmental adaptations that serve to improve perinatal survival and prepare the organism for a range of postnatal environments ([1]; [2];[3]). These processes, although adaptive in their nature, may later prove to be inadequate or disadvantageous ([1]). Early life conditions are now known to contribute to several pathologies such as mental and cardiovascular diseases, obesity and cancer, occurring much later in life ([4]). Furthermore, as dysfunctions could involve epigenetic modifications set early in life, they have the potential, in certain cases, to be transferred to subsequent generations. The perinatal period is marked by endocrine signaling pathways that control a number of morphological, developmental and physiological processes. Two of these endocrine signals are thyroid hormones (TH) and glucocorticoids (GC).

TH have prominent effects on growth, development, and metabolism of virtually every cell and organ ([5]). Thyroid diseases are among the most common endocrine disorders worldwide ([5]). On the one hand, TH deficiency has a large spectrum of effects, ranging from lower strength and mild impairment of cognitive development to severe brain and neurological damage. On the other hand, excess TH leads to thyrotoxicosis and death. Both hypothyroid and hyperthyroidism have been linked to increased risk of cardiovascular disease and osteoporosis. This also have well characterized effects on mitogenesis and apoptosis, probably explaining the fact that some thyroid diseases may be linked to increased risk of malignant disorder ([6]). Moreover, while thyroid dysfunction can have strong adverse effect on quality of life, symptoms are very general and frequently misleading. As a result, thyroid dysfunction is difficult to diagnose and often fail to be appropriately treated. Importantly, TH signaling is critical at the perinatal period in mammals, since deficiency results in abnormal development with severe mental retardation and growth defects. This syndrome, dubbed cretinism, is prevented by a single pulse of exogenous TH at birth ([7]).

GC also mediate various physiologic processes including metabolism, immune responses, stress responses and electrolyte homeostasis ([8]). Synthetic GCs are a large class of potent drugs used since five decades for treatment of inflammation, autoimmune disorders, brain

oedema, organ transplant rejection and cancer, to name a few. However, despite clinically relevant effects, GC also promote a wide range of adverse outcomes. For example, prenatal exposure to elevated GC levels, either clinically or through maternal stress or malnutrition, can re-program gene expression and increased blood pressure (a risk factor of cardiovascular-related diseases), retardation of childhood cognition development, alterations of long-term behavior, increased insulin resistance, impaired peripheral glucose intake and increased adipose tissue lypolysis ([9]). This is a cause of concern, since synthetic GCs are also used in perinatal medicine to induce lung maturation in case of threatened or preterm birth [10]. Importantly, a few molecular details of crosstalk between GC and TH signaling have been addressed, mainly through the regulation of TH metabolizing enzymes (Dio2, Dio3, [11;12]). It is noteworthy that antenatal GC treatment increases early total TH levels in premature infants, and that GC regulate peripheral metabolism of TH. In addition, human populations are exposed to increasing amounts of TH and/or GC-disruptors, which are found in biological fluids in adults, children, pregnant women and even amniotic fluid. It should be emphasized that endocrine disruptors can perturb not only the TH and GC signaling *per se*, but also their functional interactions. However, although their medical, environmental and societal cost are increasingly recognized and are believed to be high, this point is difficult to address fully because the molecular basis of many of these effects are not known. In this context, we set out to address the molecular and phenotypic crosstalk between TH and GC, *in vivo*, in a model of perinatal development.

Our working model is amphibian metamorphosis, the well known post-embryonic developmental transformation of an aquatic tadpole into an air breathing frog. This complex process implies the growth *de novo* of new body parts (limbs) and the remodeling of (almost all) organs. Interestingly, metamorphosis parallels many aspects of the perinatal period of mammals (transition aquatic vs air breathing life style, conserved gene regulatory networks, tissue resorption... [13]), including their strict control on regulation by TH. In fact, it has been proposed that TH driven metamorphosis would be an ancestral feature of vertebrates and that evolutionary and ecological inputs would provide the basis of “variations on a theme”, where subtle variations in a core signaling pathway in a range of species translates into diverse post-embryonic developmental scenarios. During natural metamorphosis, plasma GC levels rise markedly at metamorphic climax and follow that of circulating TH. Interestingly, the timing of metamorphosis is in part modulated by environmental inputs through GC signaling, which

thus acts as a physiological interface that integrates environmental cues into regulatory networks. The genomic effects of TH and GC signaling are mediated by their cognate receptors, which are ligand-dependant transcription factors belonging to the super family of nuclear receptors.

In this paper, we probe the crosstalk between TH and GC at the onset of *Xenopus tropicalis* metamorphosis. To this end, we measured transcripts levels by RNA sequencing of developing limbs and we provide evidence of a crosstalk between TH and GC signaling. This crosstalk is quite general and is not limited to the regulation by GC of the TH metabolizing factors Dio2 and Dio3, as previously acknowledged. Strikingly, GC/TH crosstalk also impact the expression of many genes involved in skeletal development, which translate in early ossification of long bones. Given that some of these genes (REL, LEPR and Dio2) are known biomarkers of human bone pathologies, our work provide the scientific community with a set of novel candidates genes which might be of interest for the development of new molecular markers of bone pathologies.

Material and Methods

Animal care

X. tropicalis adult frogs were obtained from NASCO (Fort Atkinson, WI) and maintained at 24°C in aquatic housing system (MPAquarien, Rockenhausen, Germany). Mating was induced by injection of 200 U of human chorionic gonadotropine for females and 100 U for males (Chorulon; Intervet, Beaucouze, France). Tadpoles were raised at 26°C. Animal care was in accordance with institutional and national guidelines (ref: 68008, delivered by the Cuvier Ethic Committee).

Hormonal treatments

T₃ (T2752, SIGMA) was dissolved in 0.1N NaOH and added to the culture medium to a final concentration of 10 nM. CORT (C2505, SIGMA) was dissolved in 100% DMSO (D8418, SIGMA), and added to the culture medium or the tank to a final concentration of 100 nM. All treatments received an equivalent amount of DMSO vehicle (0.001%).

Hindlimb culture

Hindlimb explant cultures were carried out in order to investigate the peripheral effects of TH and GC on a developing tissue. We dissected Nieuwkoop-Faber stage 52-54 *X. tropicalis* tadpoles anesthetized on ice. The hind limb buds were amputated just above the bud and separated from the tail by resection. Special care was taken not to separate the two buds or damage the tissue between them. The pairs of hind limb buds were then dipped in 100% ethanol and washed with 65% L15 (11415-049, GIBCO) + antibiotic/antimycotic (15240-96, GIBCO). Each pair of hindlimbs were then cultured in 24 wells culture plates (FALCON), with 1 ml 65% L15 + antibiotic/antimycotic and T₃ and/or CORT at 24°C, protected from light. For each treatment, 5 hind limb buds were used. After 24 hours, the hind limb buds were dissected from the mass of tissue, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Three independent biological replicates were used for the RNA-Seq and three independent replicates were used for RT-qPCR validations.

RNA isolation and gene expression assessment

The tissues from either cultured hindlimb buds or whole tadpoles were processed as described in [14]. The endogenous control *rp18* was selected based on NormFinder [15] analysis of a panel of candidates genes. Raw results were processed using the $-2^{\Delta\Delta Ct}$

method: Data were normalized on the endogenous control *rp18* (Δ Ct). For each treatment (T_3 , CORT, T_3 +CORT), Δ Ct were normalized on the non-treated control. Resulting values corresponds to the expression fold-change compared to the non-treated control. Statistical significance was addressed with a two-tailed student *t*-test.

cDNA library preparation and sequencing

Library preparation and Illumina sequencing were performed at the Genomic Center of Paris (France) – IBENS platform, member of the “France Génomique” (ANR10-INBS-09-08). Messenger (polyA+) RNAs were purified from 1 μ g of total RNA using oligo(dT). Libraries were prepared using the strand non-specific RNA-Seq library preparation TruSeq RNA Sample Prep Kits v1 and v2 (Illumina). Libraries were multiplexed by 2 on a single flowcell lane and subjected to 50 bp single read sequencing on a HiSeq 2000 device. A mean of 85.8 ± 117.3 million passing Illumina quality filter reads was obtained for each samples.

RNA-Seq data processing

Sequencing runs quality was assessed with the FASTQC toolkit

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Redundant reads were filtered by keeping the read with the best quality score. We used *fastx* toolkit (v 0.0.13) to clip the 3' end of reads when score dropped below 30 on the Sanger scale (Phred+33). Preprocessed reads were mapped on the version 4.1 of the *X. tropicalis* genome ([16]) using bowtie 0.12.3 ([17]) with the following parameters: “-5 10 -m1 -n2 -l28”. Gene expression call is based on models aggregated from Ensembl (version 61) ([18]) and Xenbase [19]. Consistency between each replicate was assessed by Principal Component Analysis (PCA): raw read counts were subjected to a variance-stabilization transformation as described in ([20]), and PCA was applied on the top 1000 most variable genes. The eigen vector of the component corresponding to batch effects (consistent variability between replicates instead of treatments) was set to 0 and the dataset reconstructed, resulting in a denoised version of the data. Differential expression between treatments was performed with DESeq ([20]) version 1.12 with the following parameters: *method*=“pooled”; *sharing-mode*=“maximum”; *fit-type*=“parametric”. Genes with low expression value were discarded as described in the DESeq, with $\theta=0.4$. Genes statistically differentially expressed were called at an FDR of 5%. Genes were grouped in 81 clusters according to their expression profiles. We used fuzzy c-mean clustering, a method akin to k-mean clustering but less sensitive to noise, using the mfuzz package ([21]). We kept clusters corresponding to interactions between T_3 and CORT,

and discarded the others. “Antagonistic” genes and “potentiated” genes were distinguished in two lists, and subjected to a final round of clustering to cancel out over-clustering. Culture effects were removed by filtering out genes with different expression profiles in hindlimb buds and whole tadpoles. Functional annotation and biological “contexts” (tissues, pathologies, biological processes) are based on manual curation of NCBI gene database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), the HuGe Navigator database ([22]), and literature. Functional interactions between genes were collected from BioGrid ([23]). Automated functional annotation was done using the g:Profiler suite of tools ([24]).

Skeletal preparations on tadpoles

Tadpoles stage NF54 were treated as previously described and sacrificed 24 hours after the end of the treatment. After eyes and viscera removal, tadpoles were washed for 15 min in ethanol baths of increasing concentration (25%, 50%, 75%, 100%) and stored at -20 C. Cartilage staining was carried out by incubation with Alcian Blue (A3157, SIGMA) 0.05% in a 4:1 EtOH 100% / glacial acetic acid solution overnight at 4°C and light agitation. After 2 EtOH 70% washes (2h each), progressive rehydration and tissue maceration in 0.5% KOH / 3% H₂O₂, bones were stained in 0.05% Alizarin Red (A5533, SIGMA) in KOH 1% for 3 hours. After thorough washing, stained tadpoles are stored in glycerol 100% at 4°C. Pictures were taken on a MZ16F (LEICA), and acquired thanks to a Retiga SRV (QIMAGING) coupled to an RGB-HM-S-IR filter (QIMAGING).

Results

Characterization of hindlimb bud transcriptome by RNA-Seq

In order to address the interactions between TH and GC signaling pathways at the transcript level without the confounding central effects, we cultured pre-metamorphic *X. tropicalis* hindlimb buds treated or not with T_3 and / or CORT. Total RNA were extracted after 24h and subjected to quality controls (Fig S1, “Biological sample collection and processing”). Proper biological response to hormonal treatments was assessed prior to sequencing by measuring transcript levels of *klf9*, a well known CORT and T_3 target (Fig S2). Transcript abundance was strongly induced following T_3 and CORT treatment. The simultaneous treatment with both hormones resulted in higher transcript level compared to each treatment alone. These results agree well with previous reports ([25]), and further confirm the combined effects of both T_3 and CORT in our experiment.

After deep sequencing, raw data were subject to standard RNA-Seq processing procedures (“low level processing” Fig S1) with quality controls. Mapping statistics are shown in Table S1. Importantly, we confirmed that sequencing depth was high enough and resulted in about 73% of gene detection (Fig S3). One library (CORT treatment, replicate 3, Table S1) was sequenced at a much higher depth, which marginally affected the detection of expressed genes (bottom panel Fig S3). Also, we corrected for batch effects after principal component analysis (PCA) by removing the corresponding principal component (Fig S4A before batch effect removal, Fig S4B after batch effect removal).

Overall, we found 3,793, 29 and 4,367 genes differentially expressed in T_3 , CORT and T_3 +CORT treatments respectively (Fig 1, Table S2), for a total of 4,741 genes differentially expressed in at least one treatment compared to the control. Induction folds (in log2) varied over a large dynamic range: between -6.33 and 7.52 for T_3 treatment, -2.48 and 3.74 for CORT, and -4.53 and 8.19 for T_3 +CORT.

The technical validation of RNA-Seq data was carried out by RT-qPCR on a number of genes selected over a wide range of expression levels and induction folds (Fig S5A). We found a good correlation ($r = 0.847$) between RT-qPCR and RNA-Seq measures of gene expression (Fig S5B).

Glucocorticoids interfere with thyroid hormone signaling

Interactions between TH and GC signaling can result in two different expression profiles: “antagonistic” (where the effect of one hormone decreased the effect of the other) and “potentiated” (where the effect of one hormone increased the effect of the other). To isolate “potentiated” and “antagonistic” genes, we carried out expression profile-based clustering on genes that were differentially expressed in at least one treatment (Fig S1, “clustering”). This has the benefit of better controlling the level of false negatives relative to approaches purely based on *p*-values. This may have important biological consequences since many genes may be assigned to incorrect categories. We could classify genes into the two categories of expression profiles: 203 “antagonistic” genes and 440 “potentiated” genes. We further filtered these gene lists to remove culture effects. To this end, we kept genes for which the expression profile was consistent in both cultured hindlimb buds and hindlimb buds isolated from whole treated tadpoles (Fig S1). This resulted in a final dataset of 11 clusters composed of 112 “antagonistic” (Fig 2A,B) and 206 “potentiated” genes (Fig 2C,D), Table S3. For most clusters, the T_3 effect is altered in T_3 and CORT co-treatment (Fig 2A,C). A modulation of the CORT effect by T_3 is found in only two clusters (Fig 2B,D).

The number of genes per cluster ranged from 3 (cluster 3) to 70 (cluster 11). For antagonistic profiles, 30% of the genes (34/112) correspond to a decrease of the T_3 -mediated induction by CORT, while of 70% of the genes (78/112) correspond to a decrease of the T_3 -mediated repression. For “potentiated” genes, this situation is less contrasted, with 42% of the genes corresponding to a “potentiated” T_3 effect are upregulated and 58% downregulated.

Interestingly, in co-treatment, antagonism of T_3 effects (Fig 2A) arises irrespectively of the CORT effects alone. Indeed, clusters 1, 2 and 4 show little or no CORT effect alone, while the T_3 effect is strongly affected in co-treatment. A similar conclusion can be drawn for cluster 3 and clusters 5, with a small to strong induction or repression in CORT treatment alone. In cluster 6, the strong CORT effect is weakened by T_3 , although T_3 alone has no effect (Fig 2B). “Potentiated” effects (i.e. CORT driven increase of T_3 effect, Fig 2C) occur only when the CORT and T_3 effects both correspond to an induction or a repression of gene expression. This is also true for cluster 11, where T_3 and CORT co-treatment increases the CORT effect, although T_3 alone has no effect (Fig 2D).

Glucocorticoid affect TH driven expression of genes involved in skeletal establishment and maintenance

Gene ontology analysis on the final datasets revealed enrichment in terms typically

associated with response to TH and GC: inflammation, immune system, metabolism and cell cycle. Comparison with KEGG pathways and the REACTOME database lead to a similar conclusion. These categories are consistent with known biology of TH and GC at a physiological, cellular and molecular level. We then set out to further characterize the function of the genes composing our final dataset, and completed these analyses with a systematic and manual review of the biological functions and pathologies associated to these genes (bibliography and NCBI gene pages). We then derived a map connecting each gene to biological functions / pathologies (Fig S6, black links). We also included the functional interaction map from the BioGrid database ([23]) (Fig S6, magenta links). Strikingly, we found strong connections with skeletal development, maintenance and the associated pathologies (Fig 3A). A summary of these interactions is shown Fig 3B, where the dataset is restricted to the categories related to skeletal structure, development and maintenance (“matrix”, “bone”, “cartilage”) and pathological contexts (“rheumatoid arthritis”, “osteoarthritis”, “osteoporosis”, and “spondylitis ankylosis”). We could confirm RNA-Seq results by RT-qPCR (Fig S7).

Almost half of the genes (24/53) are involved in limb development and skeletal structure establishment, while 35/53 are linked to pathologies. We found a limited number of functional interactions between genes. In fact, with the exception of *capn1-sh3bgr*, all interactions connect together *kif22*, *tat*, *il8*, *txnip*, *txn*, *cd40*, *tank*, *traf3m*, *pik3r1*, *dlx2*, *sco1*, most of which are connected to various skeletal pathologies (7/11). Only two genes (*tat* and *sco1*) are not connected either to structural or to pathological components. Genes are mostly connected to osteoarthritis and rheumatoid arthritis (53%, 28/53). Interestingly, 31% (12/39) of genes connected to pathologies are known to be involved in the genesis of skeletal alterations and disorders.

Crosstalk between GC and TH affects skeletal development during metamorphosis

We next addressed whether the interaction between TH and GC at the transcriptomic level translates into morphological changes during hindlimb development. To this end, we treated premetamorphic NF54 tadpoles with a 24h pulse of 10 nM T₃ and/or 100 nM CORT, and carried out bone and cartilage staining after 48h (no difference was observed just after the treatment). For the control experiment as well as the T₃ and CORT treatment, the developing hindlimb showed strong and uniform blue staining corresponding to cartilage. Strikingly, after co-treatment with T₃ and CORT, limb showed a strong and localized red staining at the center of the long bones, indicative of early ossification (Fig 4A).

Discussion

In this paper, we show that GC and TH pathways interact at the post-embryonic transition. The importance of TH and GC signaling as integral components of the functional relays coordinating developmental processes is well described ([26]). In addition to their role in development and the control of homeostasis, perturbations of these two pathways are also linked to a number of human diseases and pathologies. The GC pathway is of special interest because of the popular use of GC-based anti-inflammatory therapies, for example in provoking lung maturation in newborns. Little is known about the crosstalks between TH and GC pathways at this post-embryonic transition and their potential effects later in life.

What is the transcriptional landscape of the GC - TH crosstalk?

After TH and GC co-treatment, the vast majority of genes follow a very stereotyped response corresponding either to a pure TH or GC effect. Surprisingly, only a moderate number of genes (~ 300) display altered expression profile and reflect interactions between TH and GC signaling ('potentiated' and 'antagonistic' genes). Given the large number of TH-responsive genes, this effect is qualitatively modest. Strikingly, we found a very limited number of GC regulated genes, suggesting that in absence of TH, limb growth is poorly responsive to GC or that GC effects are efficiently buffered by non genomic cascades. Therefore, relative to GC signaling, the crosstalk effect is massive and results in ~ 10 times more genes differentially expressed. This may have strong functional implications.

At first, it may be tempting to summarize the GC – TH crosstalk as a direct consequence of the modulation of transcripts abundance of *dio2* and *dio3*. If true, one would expect an enhanced TH response corresponding only to a 'potentiating' effect. This is clearly not the case because the number of 'potentiated' genes is rather modest, relative to the TH effect. In addition, this view fails to account for 'antagonistic' expression profiles. Alternatively, one might argue that the expression of a large number of genes already reached a maximum, thus masking the potentiating effect of the crosstalk. By inducing general metabolism, TH treatments may result in an increase of the total mRNA content per cell. This is unlikely, however, because in our datasets the total read count is not dominated by a limited subset of highly TH responsive genes. Therefore, the crosstalk between GC and TH signaling may not

be limited to the consequences of the *dio2* and *dio3* deregulation, and involves additional molecular mechanisms. In support of this, Kulkarni and Buchholz ([27]) reached similar conclusions and proposed a number of possible regulatory scenarios.

The fact that an interaction exists between these two signaling pathways is not surprising and is already known, and crosstalks take place at different levels in signaling pathways. For example, GC induce the expression of the TH activating enzyme *dio2* and reduce expression of the inactivating enzyme *dio3*. Thus the levels of active TH in target tissues increase and fuel an enhanced TH response ([28]). Also, TSH and ACTH levels are both controlled by CRH (Denver, 1997, Denver, R.J., 1999. Evolution of the corticotropin-releasing hormone signaling system and its role in stress-induced phenotypic plasticity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 897, 46–53.), which plays a key role in controlling TH dependant post embryonic development. GC is also known to increase the binding capacity of THR to T3 ([29]). At the transcriptional level, GC enhance TRb transcripts level ([25]), and GC and TH synergistically enhance KLF9 expression ([30]). In addition, transcripts levels of GR are modulated by TH in a tissue specific manner ([31]). A number of additional cis-regulatory mechanisms of interactions between GR and other nuclear receptors have also been described ([32]; [33]).

Kulkarni and Buchholz reported recently a micro-array analysis of the GC – TH crosstalk at the post-embryonic transition, in *Xenopus tropicalis* tail. The most striking difference between their dataset and ours is that they found a strong GC effect (~1900 vs ~30 genes) and a large number of genes responding to the crosstalk (~1200 vs ~300 genes). We note, however, that the comparison is somewhat limited because of tissue specific differences, distinct technological platforms (micro-array vs RNA-Seq) and analysis pipelines (Venn diagrams vs clustering), as discussed by Grimaldi et al. ([34]). Nonetheless, we describe here important datasets providing novel insights on the phenotypic output of the GC-TH crosstalk, at the end of post-embryonic development and their potential long terms effects.

What is the functional output of the TH – GC crosstalk?

Strikingly, the crosstalk affects various mediators of the formation and turnover/homeostasis of bone and cartilage, with clear links to pathologies of skeletal structures (Fig 3). This is mediated mostly by alteration of extracellular matrix metabolism and cellular communications.

The corresponding pathways are affected (e.g. TOLL, TNF), although for each of them, the expression of only a few components is affected in the crosstalk. For example, in the TOLL pathway, the expression profile of the pro-inflammatory cytokine IL8 [35] and CD40 ([36]) are consistent with an anti-inflammatory action, following the potentiated repression of TRAF3. The synthesis of extracellular matrix (ECM) components are also affected (ADAMTSL5, EMILIN2, MMP13, MMP13L). They are consistent with ECM remodeling and a rapid turnover of cartilage and bone cell populations.

Our datasets provide novel connections between known pathways or factors and skeletal pathologies. For example, QSOX1 expression follows the clinical grade of breast tumor, but was not previously linked to skeletal pathologies [37]. Of note, breast cancer cells often metastasize to bone structures. The product of the SLC35A3 gene, of unknown function, was thought to be connected to vertebral malformations in human and cattle, although no clear evidence could be reported. TAT expression is related to the Richner-Hanhart syndrome but no link to skeletal pathologies has been reported [38].

The links we provide here illustrate the potential of our datasets as a source of factors potentially involved in the development of human pathologies. Obviously, developmental alterations of skeletal anatomy at the perinatal period (*i.e.* the end of the post-embryonic transition) will most certainly have strong effects later in life and could be detected early. More subtle phenotypes, such as alteration of bone internal fine structure or of signaling pathways, would be more difficult to detect and may lead to delayed diagnosis, treatment and increased societal and economic cost. By providing a number of potential candidates interfering with proper TH and GC at the post-embryonic transition, we hope to contribute to the development of novel markers of perinatal pathologies.

Importantly, we would like to highlight the fact that although we used GC as a direct mediator of stress, the source of crosstalk may have multiple origins. In addition to the clinical use of GC, exposure to endocrine disruptors may affect the balance of circulating levels of GC and TH, thus potentially increasing exposure to crosstalk. Currently, the extent of the crosstalk in other tissues is poorly described and would need further investigation. In a broader perspective, integrative mechanisms, and especially the TH and GC signaling, are essential for adaptation to ongoing global change because they modulate life-history trade-offs. Our results show that crosstalk may counter-balance these adaptive responses and, thus, may affect the ability to cope with a changing world([1]).

Acknowledgements

We thank J.-P. Chaumeil and G. Benisti for animal care. This work was supported by the “Centre National de la Recherche Scientifique”, the “Muséum National d’Histoire Naturelle”, “TRIGGER” (ANR-08-JCJC-0100-01), “IDEAL”, a large Integrated Project funding from FP7 (contract n°259679) and « MethylDev », a PICS CNRS funding program.

References

- Anders ,S. and HuberW. 2010. Differential expression analysis for sequence count data.. *Genome biology* 11:p. R106
- Andersen ,C.L., Jensen,J.L. and OrntoftT.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:pp. 5245-5250
- Angelier ,F. and WingfieldJ.C. 2013. Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: theory, hypotheses and perspectives. *Gen Comp Endocrinol* 190:pp. 118-128
- Bickel ,M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 64:pp. 456-460
- Bilesimo ,P., Jolivet,P., Alfama,G., Buisine,N., Le Mevel,S., Havis,E., Demeneix,B.A. and SachsL.M. 2011. Specific histone lysine 4 methylation patterns define tr-binding capacity and differentiate direct t3 responses.. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 25:pp. 225-237
- Boelaert ,K. and FranklynJ.A. 2005. Thyroid hormone in health and disease.. *The Journal of endocrinology* 187:pp. 1-15
- Bonett ,R.M., Hoopfer,E.D. and DenverR.J. 2010. Molecular mechanisms of corticosteroid synergy with thyroid hormone during tadpole metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol* 168:pp. 209-219
- Bonett ,R.M., Hu,F., Bagamasbad,P. and DenverR.J. 2009. Stressor and glucocorticoid-dependent induction of the immediate early gene kruppel-like factor 9: implications for neural development and plasticity.. *Endocrinology* 150:pp. 1757-1765
- Bouyacoub ,Y., Zribi,H., Azzouz,H., Nasrallah,F., Abdelaziz,R.B., Kacem,M., Rekaya,B., Messaoud,O., Romdhane,L., Charfeddine,C.et al. 2013. Novel and recurrent mutations in the tat gene in tunisian families affected with richner-hanhart syndrome. *Gene* 529:pp.

- Bowes ,J.B., Snyder,K.A., Segerdell,E., Gibb,R., Jarabek,C., Noumen,E., Pollet,N. and VizeP.D. 2008. Xenbase: a xenopus biology and genomics resource. *Nucleic Acids Res* 36:p. D761-7
- Braun ,T., Challis,J.R., Newnham,J.P. and SlobodaD.M. 2013. Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk.. *Endocrine reviews* 34:pp. 885-916
- Crespi ,E.J. and WarnerR.W. 2013. Environmental conditions experienced during the tadpole stage alter post-metamorphic glucocorticoid response to stress in an amphibian. *Integr Comp Biol* 53:pp. 989-1001
- Denver ,R.J. 2013. Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. *Curr Top Dev Biol* 103:pp. 195-227
- Denver ,R.J., Ouellet,L., Furling,D., Kobayashi,A., Fujii-Kuriyama,Y. and PuymiratJ. 1999. Basic transcription element-binding protein (bteb) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. evidence for a role in neurite outgrowth.. *The Journal of biological chemistry* 274:pp. 23128-23134
- Elgueta ,R., Benson,M.J., de Vries,V.C., Wasiuk,A., Guo,Y. and NoelleR.J. 2009. Molecular mechanism and function of cd40/cd40l engagement in the immune system.. *Immunological reviews* 229:pp. 152-172
- Flicek ,P., Amode,M.R., Barrell,D., Beal,K., Billis,K., Brent,S., Carvalho-Silva,D., Clapham,P., Coates,G., Fitzgerald,S.et al. 2014. Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res* 42:p. D749-55
- Galton ,V.A. 1990. Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone.. *Endocrinology* 127:pp. 2997-3002
- Grimaldi ,A., Buisine,N., Miller,T., Shi,Y. and SachsL.M. 2012. Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: lessons from amphibian studies. *Biochim Biophys Acta* :
- Gupta ,M.K., Singh,D.B., Shukla,R. and MisraK. 2013. A comprehensive metabolic modeling of thyroid pathway in relation to thyroid pathophysiology and therapeutics. *OMICS* 17:pp. 584-593
- Hellsten ,U., Harland,R.M., Gilchrist,M.J., Hendrix,D., Jurka,J., Kapitonov,V., Ovcharenko,I., Putnam,N.H., Shu,S., Taher,L.et al. 2010. The genome of the western clawed frog xenopus tropicalis.. *Science (New York, N. Y.)* 328:pp. 633-636
- Hercbergs ,A.H., Ashur-Fabian,O. and GarfieldD. 2010. Thyroid hormones and cancer: clinical studies of hypothyroidism in oncology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:pp. 432-436
- Holstein ,T.W. and LaudetV. 2014. Life-history evolution: at the origins of metamorphosis..

Current biology : CB 24:p. R159-61

- Karmakar ,S., Jin,Y. and NagaichA.K. 2013. Interaction of glucocorticoid receptor (gr) with estrogen receptor (er) alpha and activator protein 1 (ap1) in dexamethasone-mediated interference of eralpha activity. *J Biol Chem* 288:pp. 24020-24034
- Kikuyama ,S., Niki,K., Mayumi,M., Shibayama,R., Nishikawa,M. and ShintakeN. 1983. Studies on corticoid action on the toad tadpole tail in vitro.. *General and comparative endocrinology* 52:pp. 395-399
- Kulkarni ,S.S. and BuchholzD.R. 2012. Beyond synergy: corticosterone and thyroid hormone have numerous interaction effects on gene regulation in xenopus tropicalis tadpoles.. *Endocrinology* 153:pp. 5309-5324
- Kumar ,L. and E FutschikM. 2007. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* 2:pp. 5-7
- Langmead ,B. 2010. Aligning short sequencing reads with bowtie.. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevarnis ... [et al.]* Chapter 11:p. Unit 11.7
- Mastorci ,F., Vicentini,M., Viltart,O., Manghi,M., Graiani,G., Quaini,F., Meerlo,P., Nalivaiko,E., Maccari,S. and SgoifoA. 2009. Long-term effects of prenatal stress: changes in adult cardiovascular regulation and sensitivity to stress. *Neurosci Biobehav Rev* 33:pp. 191-203
- Montesinos ,M.M., Pellizas,C.G., Vélez,M.L., Susperreguy,S., Masini-Repiso,A.M. and ColeoniA.H. 2006. Thyroid hormone receptor beta1 gene expression is increased by dexamethasone at transcriptional level in rat liver.. *Life sciences* 78:pp. 2584-2594
- Munck ,A.U., Náray-Fejes-Tóth,A., Jameson,J.L., Groot,L.J.D., de Kretser,D., Grossman,A., Marshall,J.C., Melmed,S., Potts,J.T. and WeirG.C.. Glucocorticoid action: physiology. In *Endocrinology: adult and pediatric*. . 2010. .
- Nicholls ,J.J., Brassill,M.J., Williams,G.R. and BassettJ.H.D. 2012. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol* 213:pp. 209-221
- Patterson ,S.H., Hahn,T.P., Cornelius,J.M. and BreunerC.W. 2014. Natural selection and glucocorticoid physiology.. *Journal of evolutionary biology* 27:pp. 259-274
- Reimand ,J., Arak,T. and ViloJ. 2011. G:profiler--a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Res* 39:p. W307-15
- Rog-Zielinska ,E.A., Thomson,A., Kenyon,C.J., Brownstein,D.G., Moran,C.M., Szumska,D., Michailidou,Z., Richardson,J., Owen,E., Watt,A.et al. 2013. Glucocorticoid receptor is required for foetal heart maturation.. *Human molecular genetics* 22:pp. 3269-3282
- Sahu ,B., Laakso,M., Pihlajamaa,P., Ovaska,K., Sinielnikov,I., Hautaniemi,S. and JanneO.A. 2013. Foxa1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer Res* 73:pp. 1570-1580

Soloviev ,M., Esteves,M.P., Amiri,F., Crompton,M.R. and RiderC.C. 2013. Elevated transcription of the gene qsox1 encoding quiescin q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. *PLoS One* 8:p. e57327

Stark ,C., Breitkreutz,B., Chatr-Aryamontri,A., Boucher,L., Oughtred,R., Livstone,M.S., Nixon,J., Van Auken,K., Wang,X., Shi,X.et al. 2011. The biogrid interaction database: 2011 update. *Nucleic Acids Res* 39:p. D698-704

Zimmermann ,M.B. 2009. Iodine deficiency. *Endocr Rev* 30:pp. 376-408

Figure legends

Fig 1: TH and GC affect hindlimb transcriptome. Relationship between the mean expression level and the difference of expression measured by RNA-Seq (MA plot). Genes reported as differentially expressed by DESeq (FDR=0.05) relative to the control are colored in blue.

Fig 2: Interactions between TH and GC signaling results in a limited number expression profiles. Expression profiles are categorized in 11 clusters. Within each cluster, expression values are summarized by a box plot. Upper and lower "hinges" correspond to the first and third quartiles. The upper and lower whiskers extend from the hinge to respectively the highest or lowest value that is within 1.5 times the inter-quartile range of the hinge. Data beyond the end of the whiskers are outliers and plotted as points. A) "Antagonistic" profiles: GC decrease either TH induced repression (clusters 1-3) or induction (clusters 4 and 5). B) Cluster 6 contains genes for which the GC induced up-regulation is decreased by TH. C) "Potentiating" clusters: GC enhances either TH driven induction (clusters 7 and 8) or repression (cluster 9 and 10). D) Cluster 11 contains genes for which the GC induced up-regulation is increased by TH. For each gene, the expression level was adjusted to a variance of 1, and normalized by the mean expression level accross all four conditions. Ø=control; T=T3; C=corticosterone; T+C=T3+corticosterone.

Fig 3: Genes co-regulated by TH and GC are functionally enriched in terms related to skeletal structures. A) Biological terms or pathologies associated to "antagonistic" or "potentiated" genes. Light blue terms are associated to the skeleton structure. B) Interaction map between the genes linked to skeletal components (corresponding to light blue terms in A) and human pathologies. Magenta edges between genes correspond to interactions described in the BioGrid database.

Fig 4: Brief glucocorticoid treatment affects skeletal development during natural metamorphosis. Morphology of hindlimb buds 24 hours after a 24 hour treatment (upper

panel). Skeletal preparation (Alcian/Alizarin) of the same samples (bottom panel). Cartilage is stained with alcian blue and bone with alizarin red.

Supplementary Figures (available from the website)

Fig S1: **General workflow of data production, processing and analysis.**

Fig S2: **Measure of KLF9 gene expression by rt-qPCR.** Letters a and b indicate significant differences between the group means based on a two tailed student t-test.

Fig S3: **Saturation analysis of RNA-seq data.** The number of expressed gene (y axis) is plotted as a function and increasing number of reads (x axis).

Fig S4: **Principal component analysis of RNA-Seq data.** The analysis was carried out on raw data (A) or after reduction of batch effects (B).

Fig S5: **RT-qPCR validations of gene expression levels measured by RNA-Seq.** Thirteen genes were chosen from RNA-Seq results over wide dynamic range of expression, as illustrated on the MA plots (A). Expression levels were measured by RT-qPCR and normalized using rpl8 as internal control, with three biological replicated. The relationship between fold changes (in log2 scale) measured by RT-qPCR and by RNA-Seq is shown in panel B.

Fig S6: **Interaction network between genes differentially expressed and biological functions and pathologies.** Yellow hexagons identify biological functions and pathologies, red vertices identifies genes with antagonistic expression profiles, green vertices identifies genes with potentiated expression profiles. Black links correspond to connections between genes and biological processes or pathologies, red dotted links represent connections between pathologies and blue links interactions between gene products.

Functional interaction data between genes were collected from the BioGrid database (Stark et al., 2011).

Fig S7: Interaction network between genes differentially expressed and biological functions and pathologies.

Supplementary Tables (available from the website)

Table S1: **Mapping statistics.**

Table S2: **Expression level of differentially expressed genes.**

Table S3: **Expression level of genes affected by TH and GC crosstalk.**

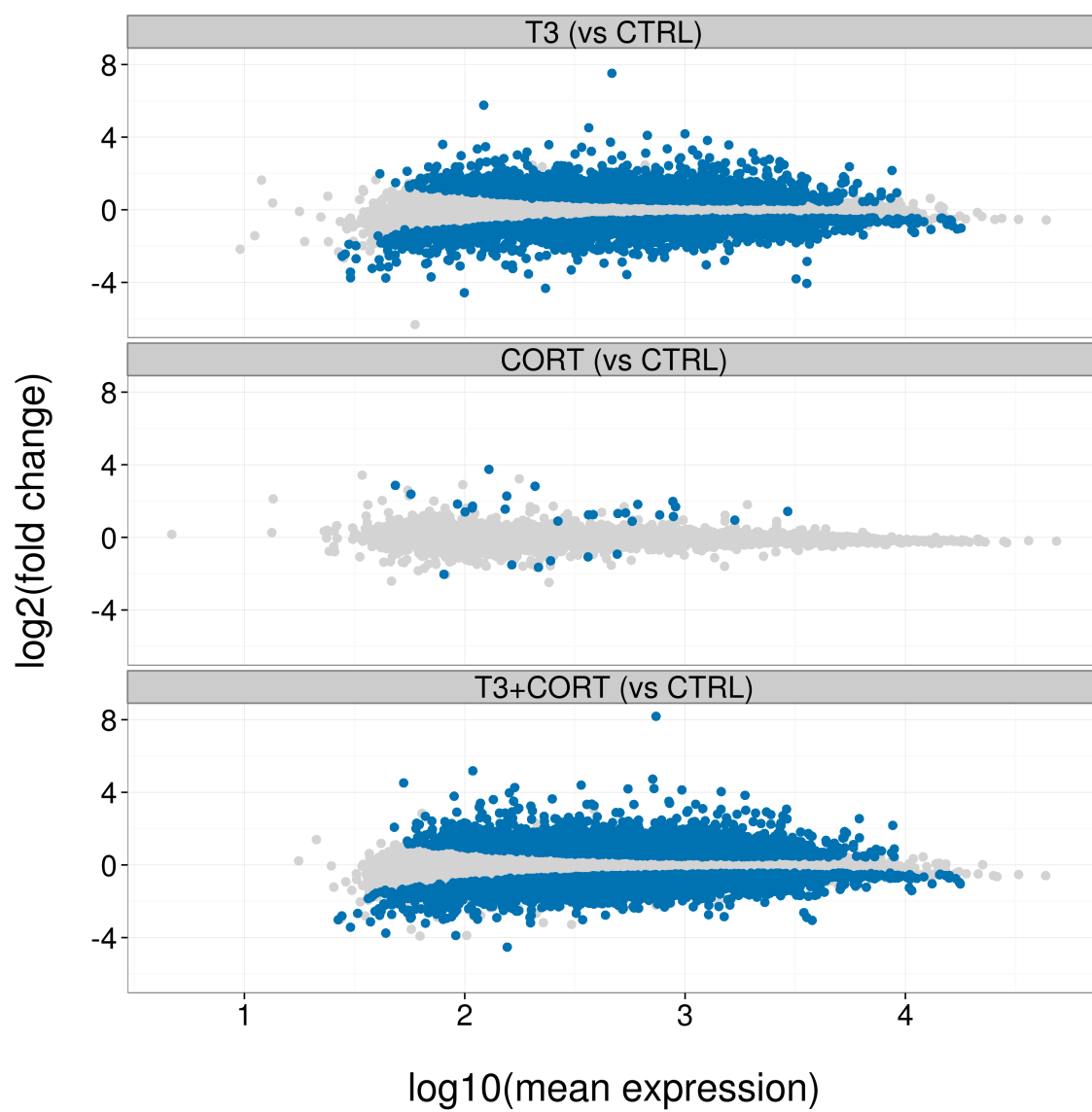


Figure 1

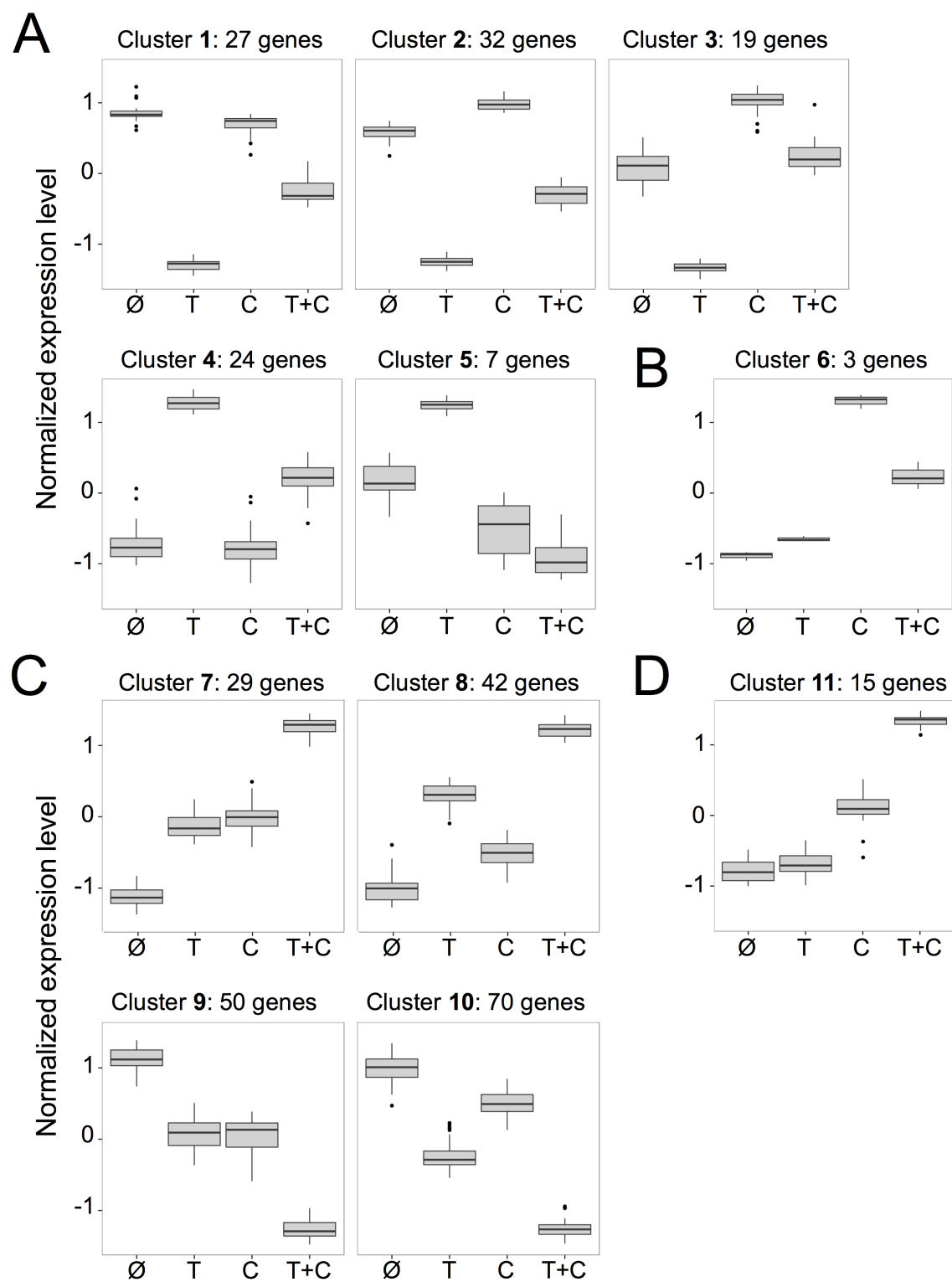


Figure 2

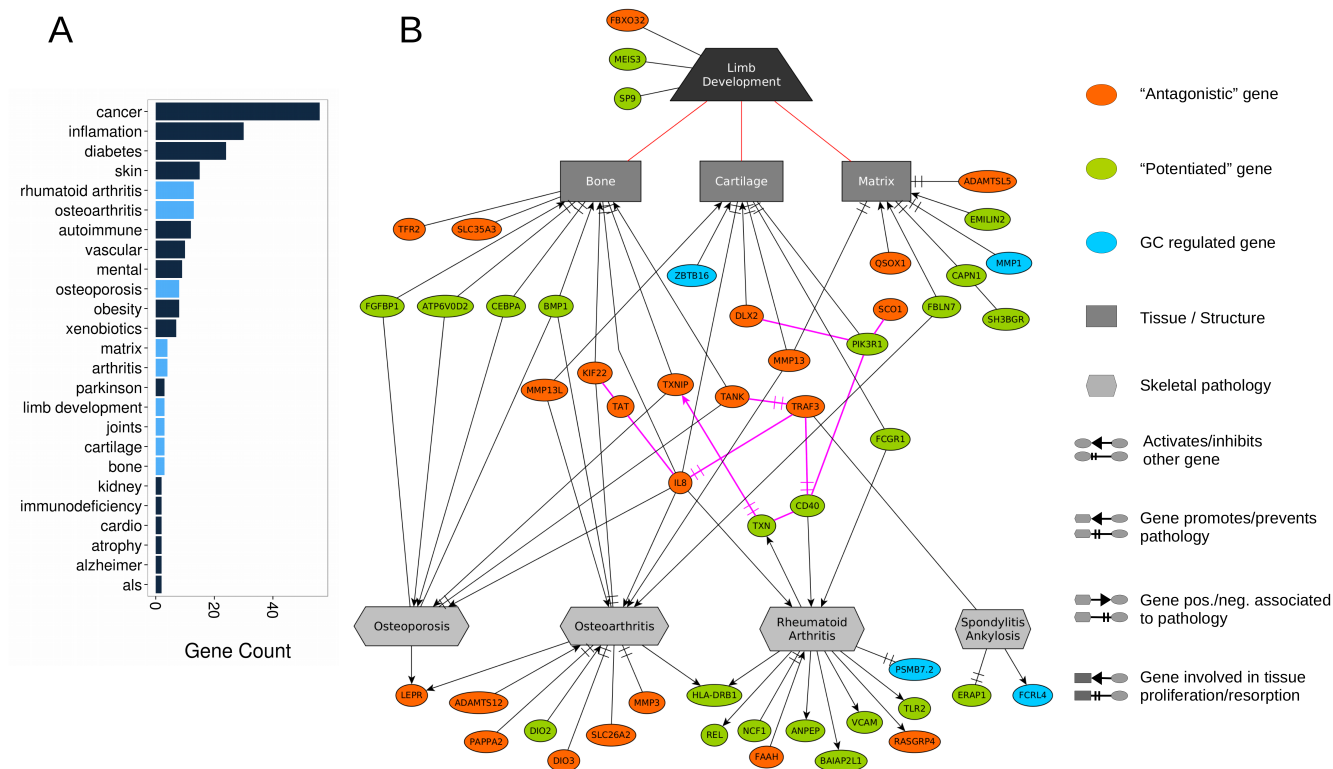


Figure 3

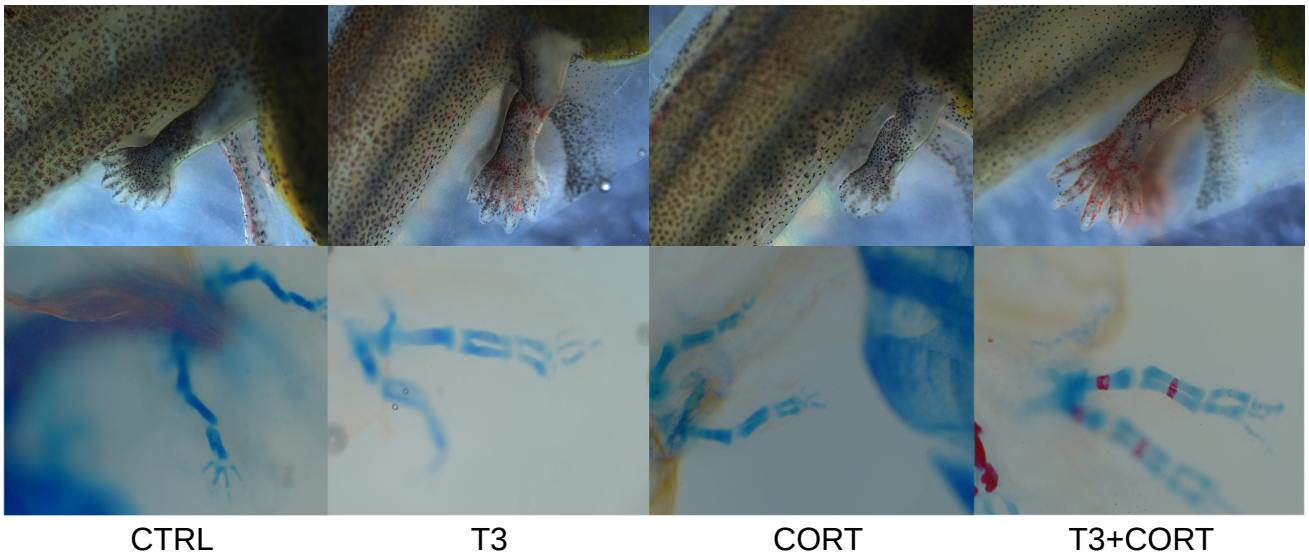


Figure 4

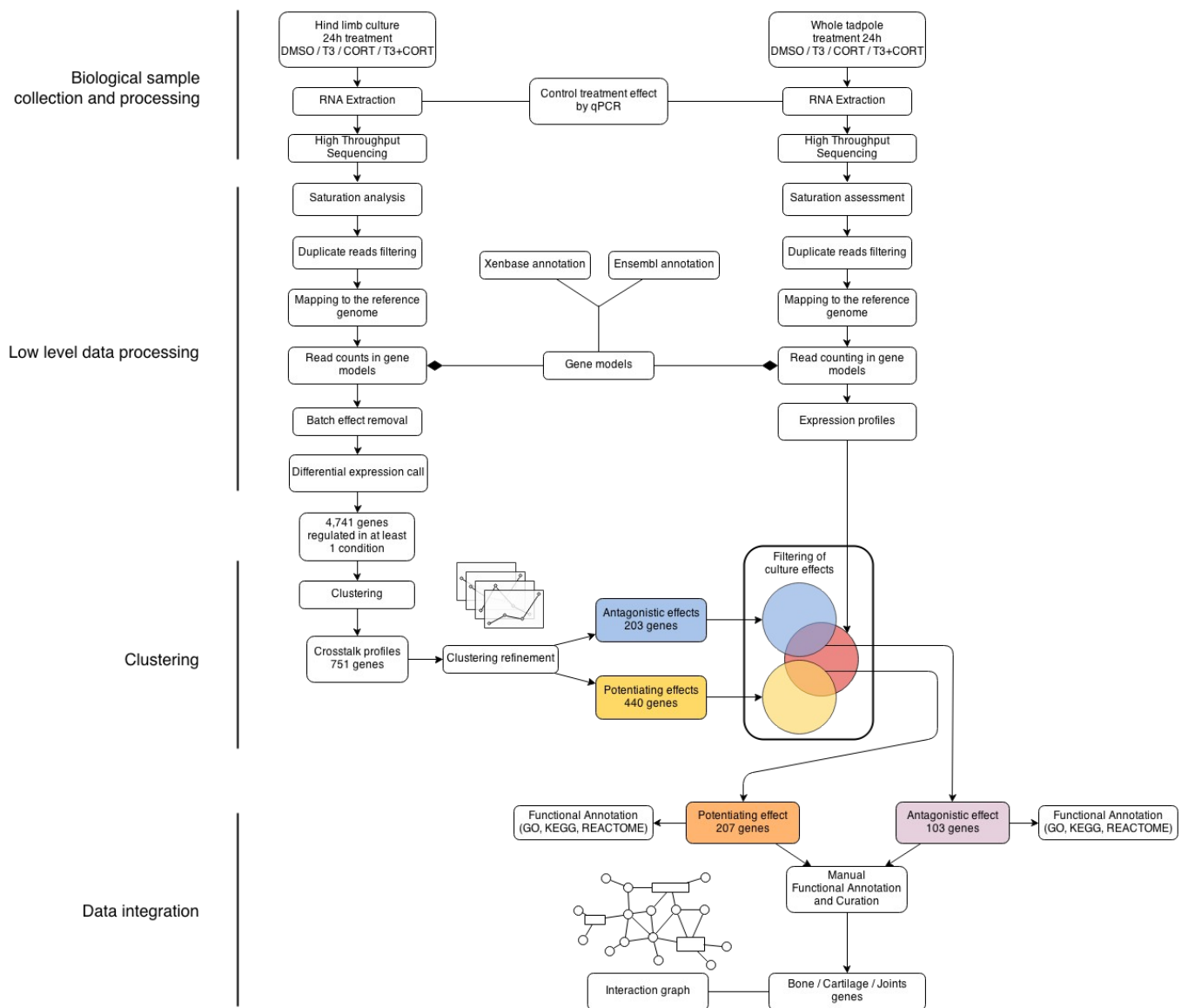


Figure S1

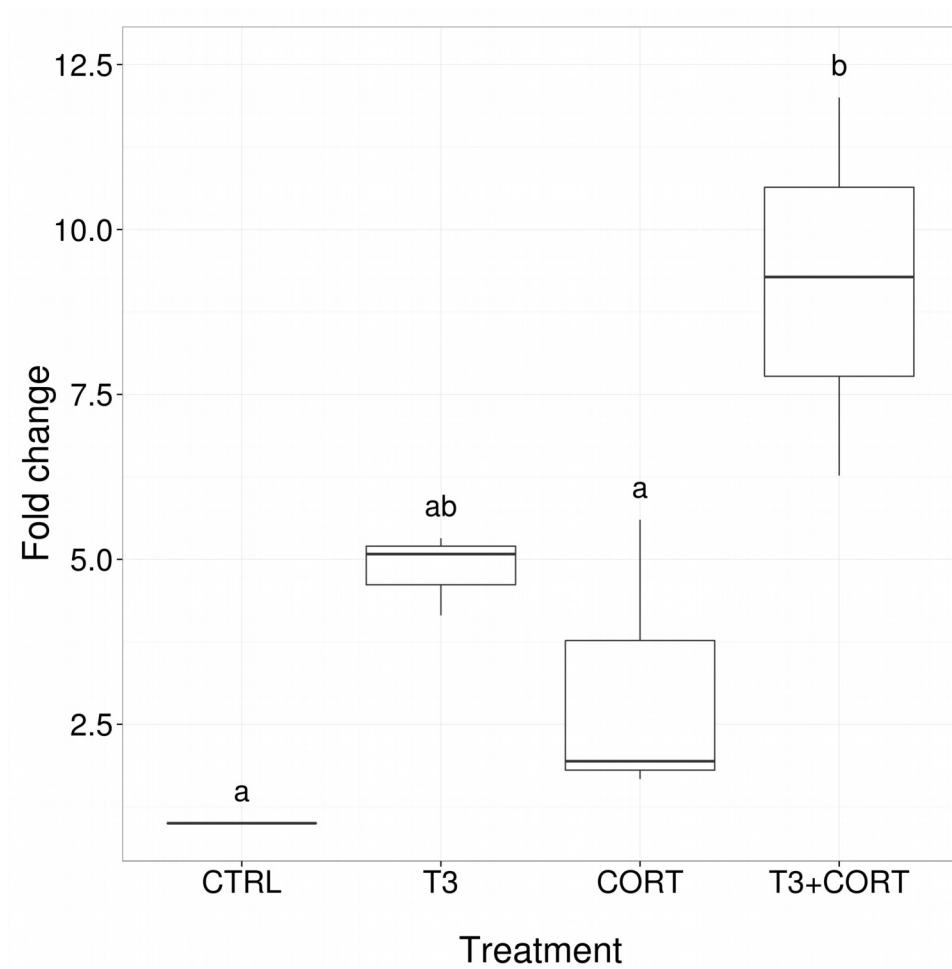


Figure S2

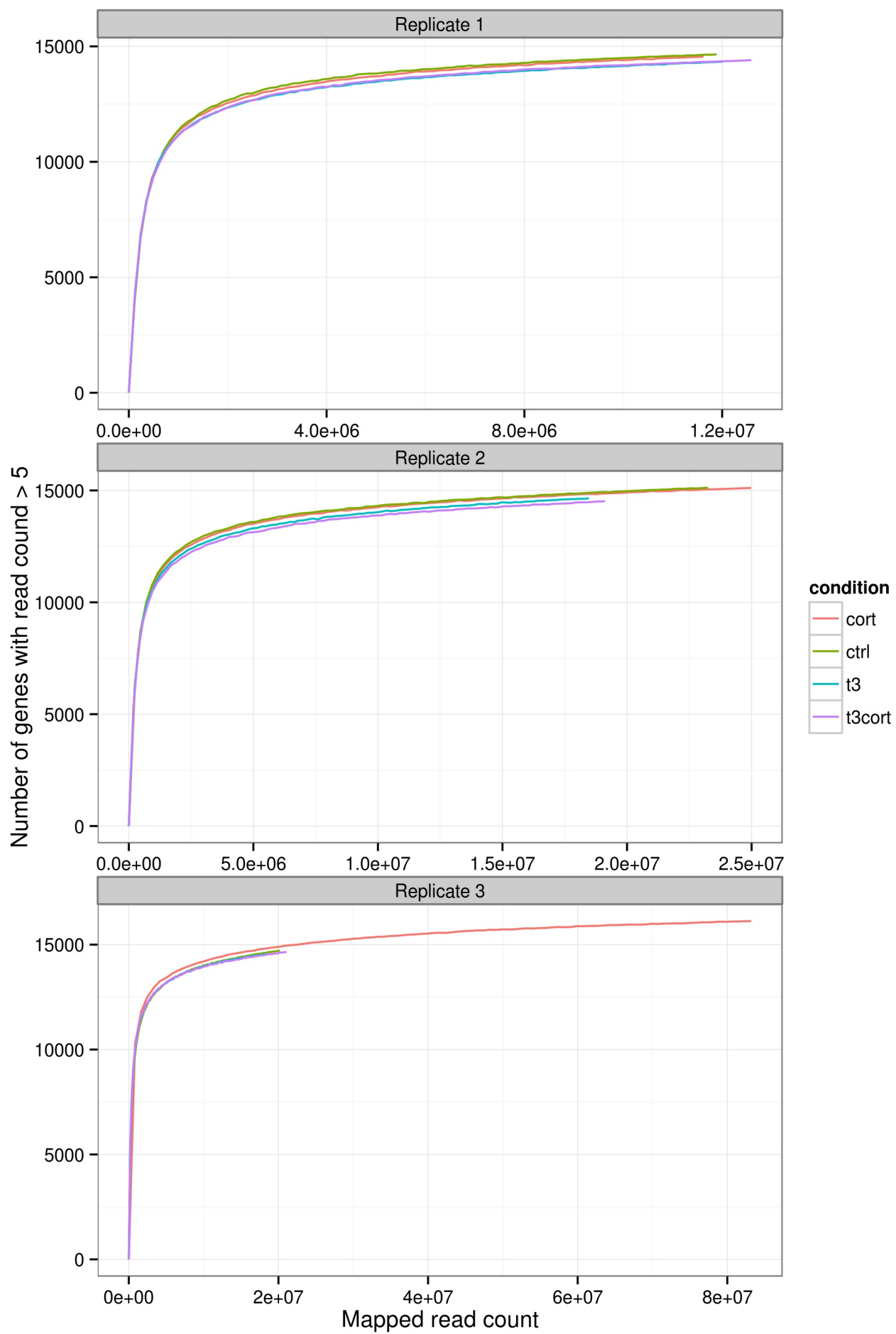


Figure S3

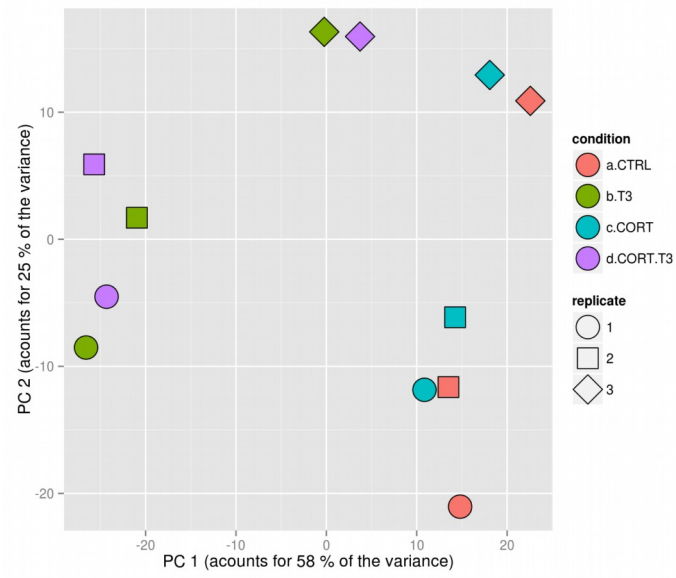
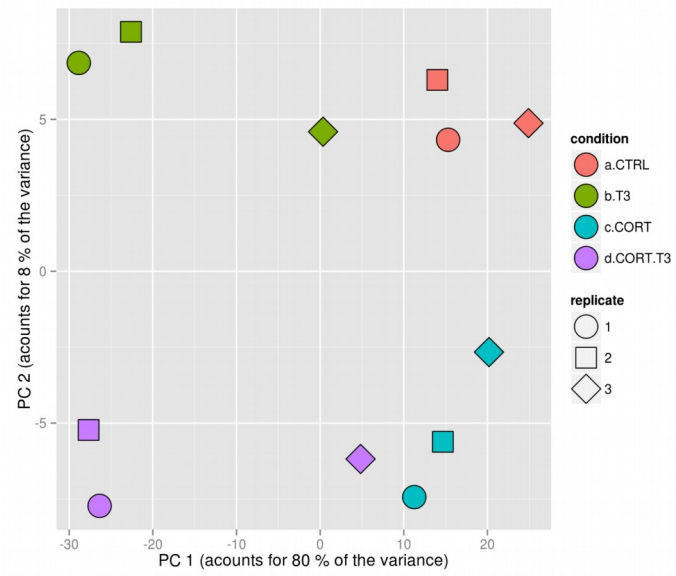
A**B**

Figure S4

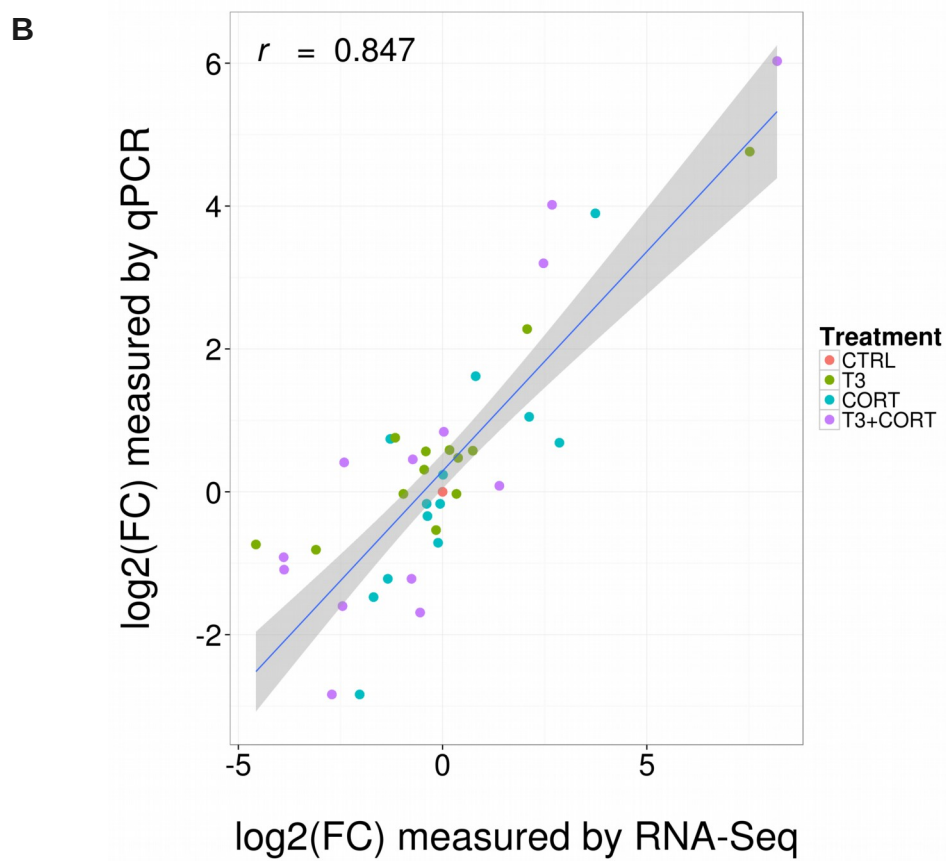
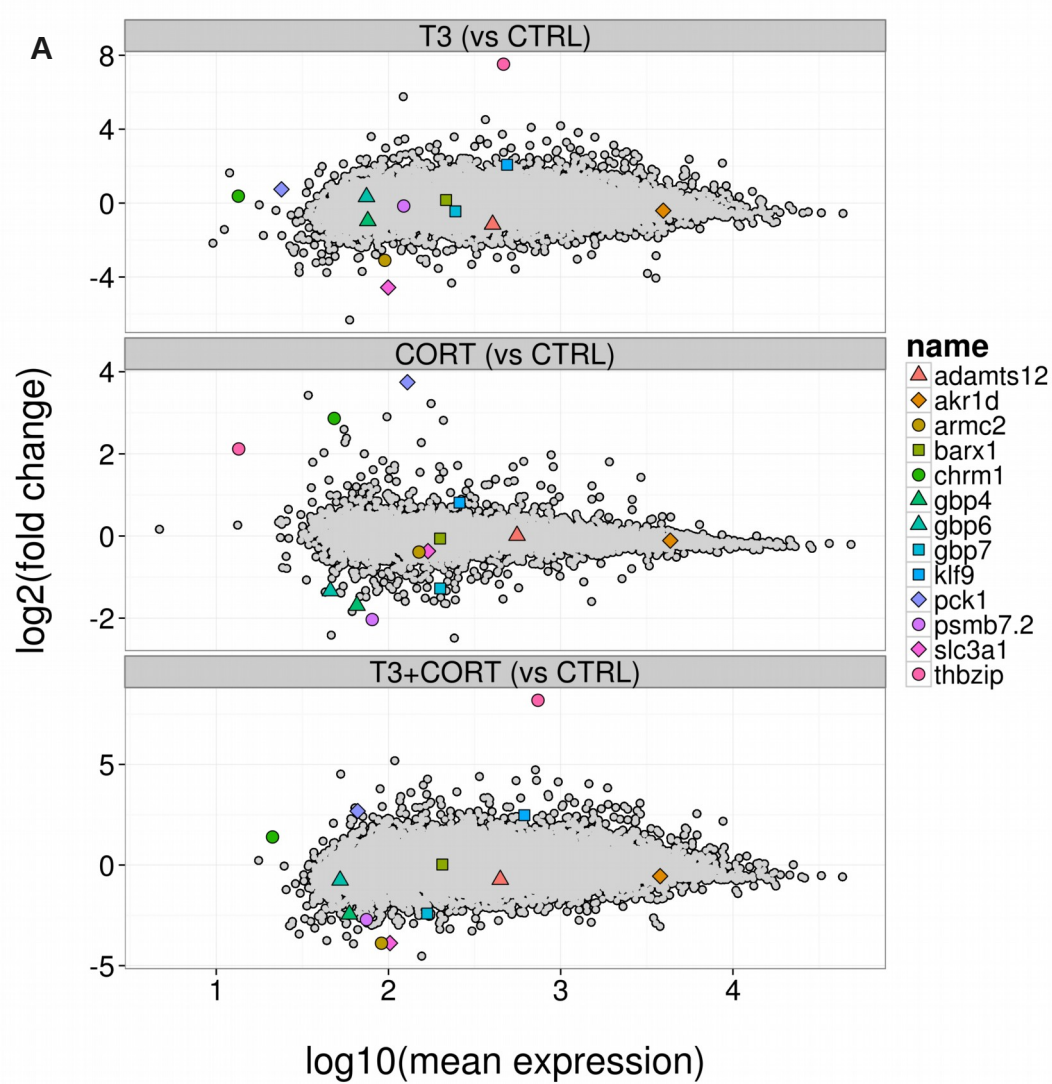


Figure S5



Figure S6

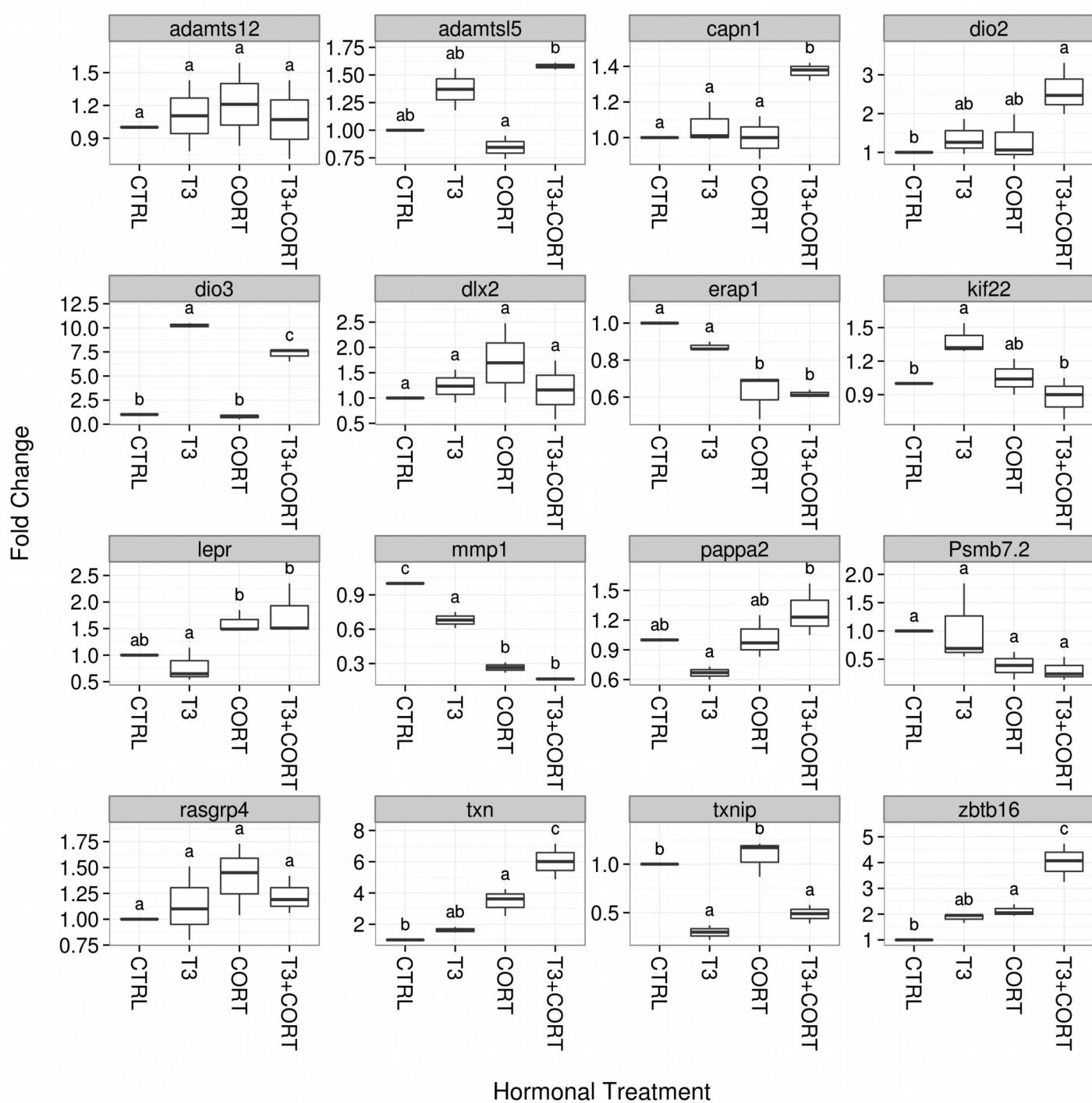


Figure S7

6.2 Annotation fonctionnelle automatique des termes enrichis dans les différentes catégories de profils d'expression

6.2.1 Analyse globale

La répartition des gènes dans les différents types de profils d'expression sont hétérogènes. Seule une minorité est affectée par le traitement aux GCs (Figure 6.1 et Figure 1 de l'article en sous-section 6.1.1). La majeure partie des profils d'expression des gènes différentiellement exprimés correspond ainsi à un effet du traitement à la T₃. Une minorité de gènes sont toutefois classifiés comme ayant une réponse à la CORT, aussi bien seule que interagissant avec la réponse à la T₃.

L'annotation fonctionnelle automatisée des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition (4741 gènes) a été réalisée avec l'outil en ligne GOrilla en utilisant l'ensemble des gènes exprimés comme "background". Il en ressort un fort enrichissement en termes associés au métabolisme des lipides, du cycle cellulaire, du système immunitaire, des ARN et au transport intra-cellulaire de molécules (Figure 6.2). Cette représentation est particulièrement adaptée à l'illustration des résultats obtenus. En effet, elle permet d'intégrer les relations entre les différents termes présentés. Ceci permet de facilement évaluer le rôle plus ou moins fin des gènes considérés (à condition que l'annotation soit complète) dans le contexte de fonctions biologiques ou moléculaires plus générales.

Une représentation condensée mets l'accent sur les catégories sur-représentées dans une hiérarchie simplifiée à 2 niveaux (Figure 6.3) : Plusieurs processus biologiques sont affectés par le traitement hormonal. Tout d'abord, le métabolisme des lipides et les voies de biosynthèse des dérivés carbohydrates et stéroïdes. La régulation fine des ARN et leur traduction semble aussi affectée, avec un effet sur des facteurs régulant le temps de demi-vie des ARN et des facteurs impliquées dans le métabolisme des ARNr (ARN ribosomal) et des ARNnc (ARN non-codant). Enfin, la physiologie de la cellule est affectée notamment au niveau du cytosquelette et du trafic intra-cellulaire. Dans une moindre mesure, le système immunitaire est

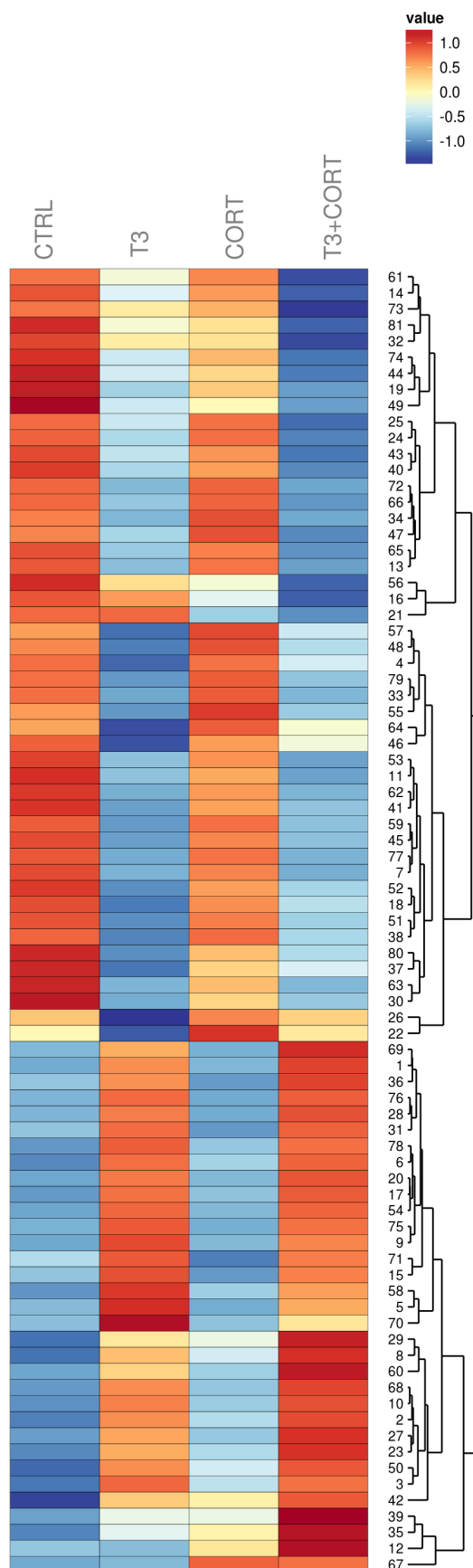
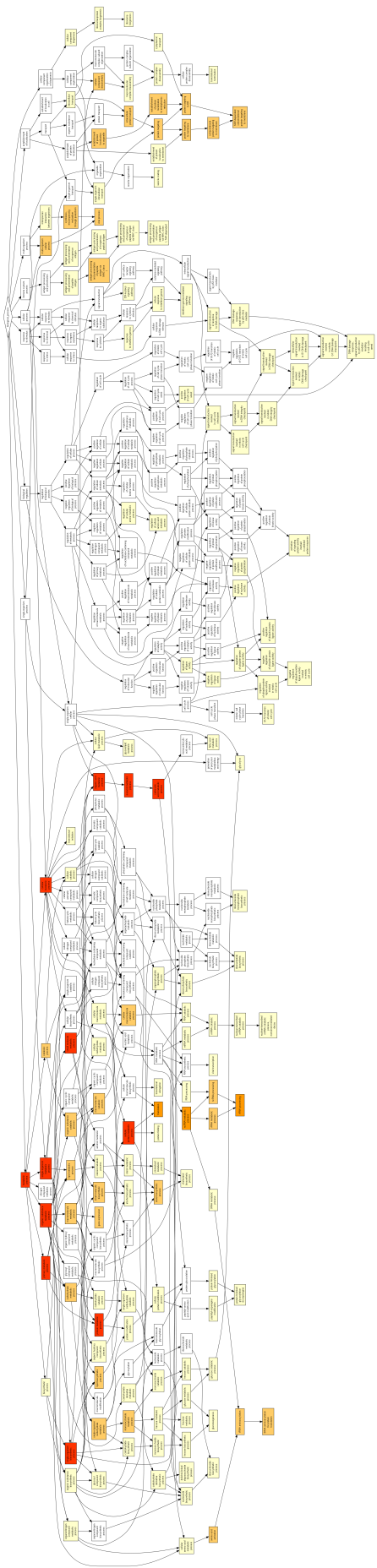
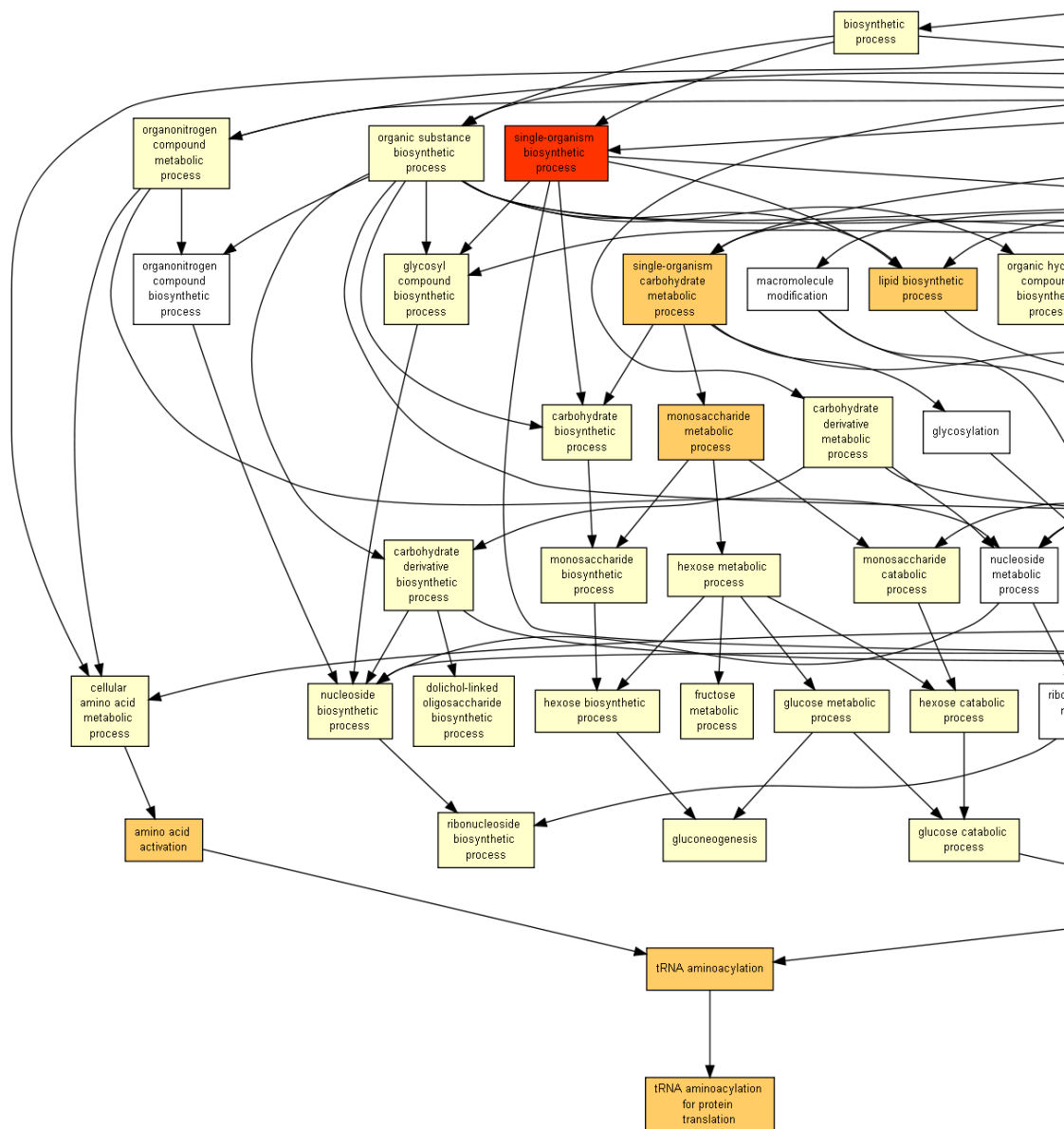


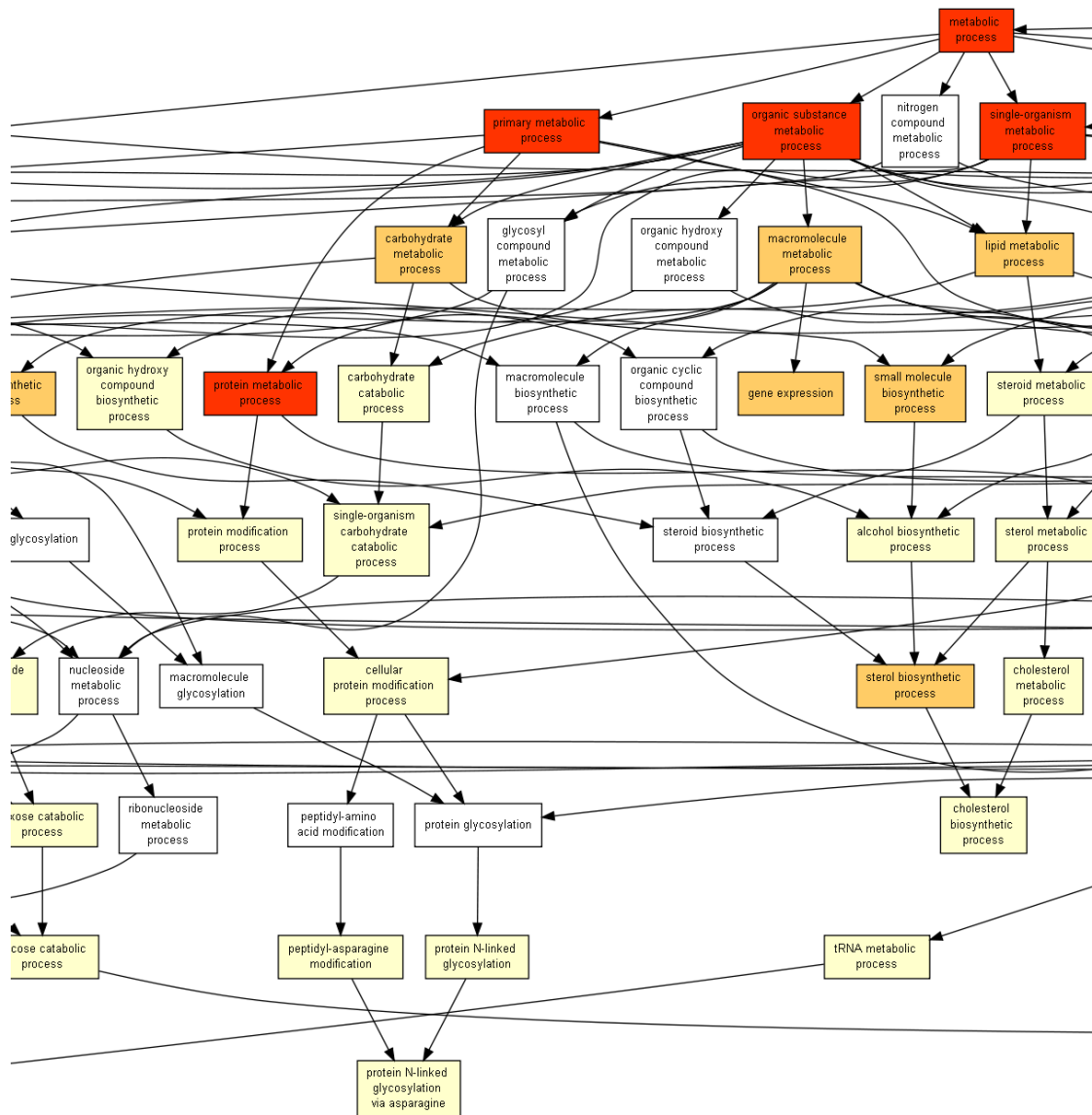
FIGURE 6.1 – Heatmap groupant 81 clusters de gènes ayant des profils d’expression similaires dans les bourgeons de pattes postérieures. Chaque ligne représente un cluster de gènes déterminé par “fuzzy c-mean clustering” (voir sous-section 6.1.1, “Materials & Methods”). Le niveau d’expression de chaque cluster est centré sur zéro, et la variance à travers les quatre traitements ajustée à un. Le dendrogramme et l’ordre des clusters est calculé sur la base de leur distance euclidienne. Les chiffres à gauche du dendrogramme correspondent aux numéros des clusters.



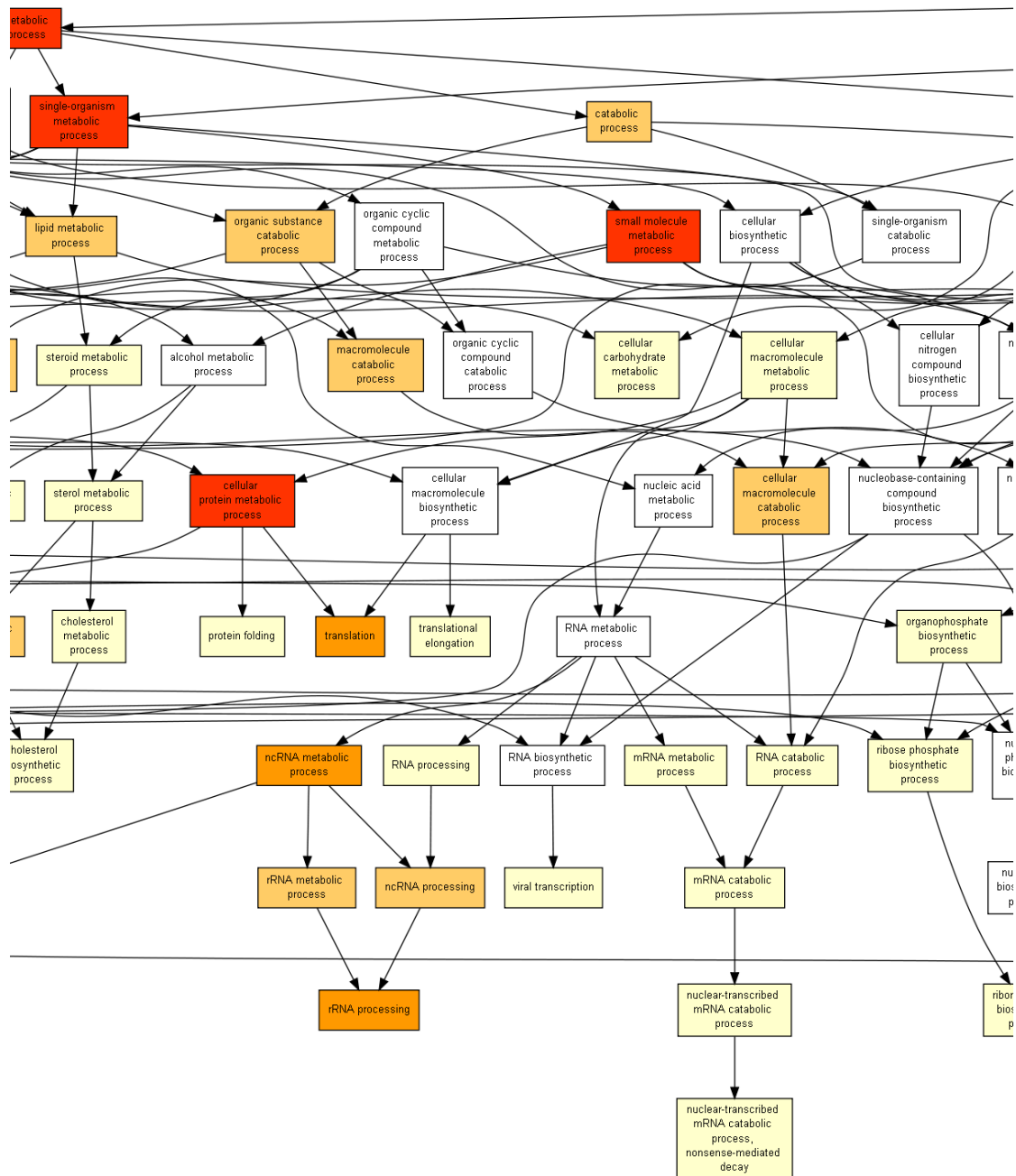
(a) Vue générale



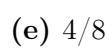
(b) 1/8



(c) 2/8



(d) 3/8



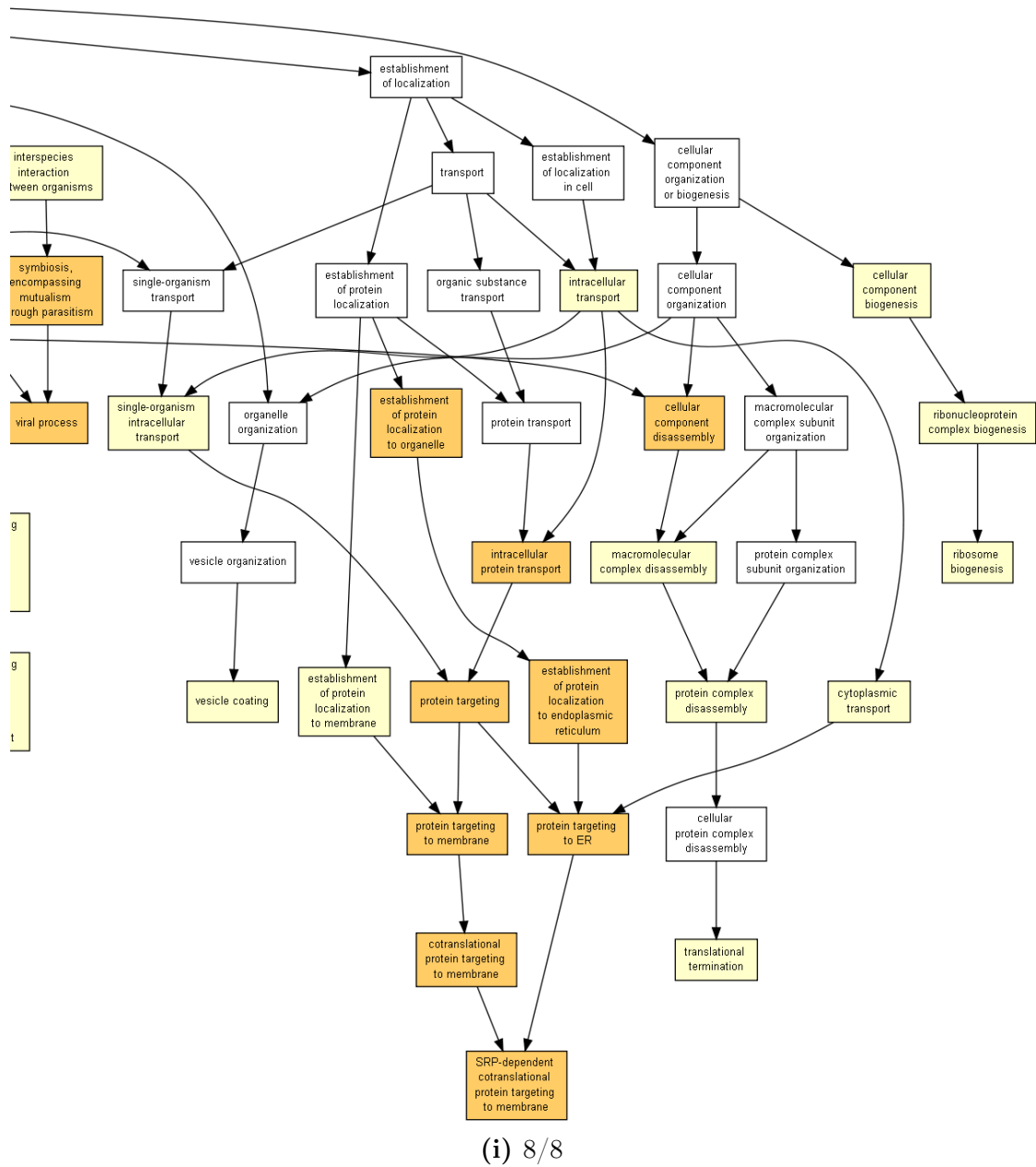


FIGURE 6.2 – (Neuf pages précédentes) Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons de pattes postérieures. a) Vue générale. b) Détail. L'enrichissement des termes comparé à l'ensemble des gènes transcrits est calculé à l'aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l'enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$ Jaune : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$ Orange : $10^{-9} \leq p < 10^{-7}$ Rouge : $p < 10^{-9}$

également affecté, ainsi que des aspects généraux du métabolisme.

6.2.2 Analyse des “clusters” spécifiques d’une interaction croisée entre les effets des deux hormones

Après avoir fait le choix délibéré de concentrer l’analyse sur les gènes affectés par les deux hormones simultanément (Figure 2 de l’article à la sous-section 6.1.1), j’ai répété l’annotation fonctionnelle des gènes dans les différentes catégories de profils d’expression, parmi les profils antagonistes et “potentiation” en distinguant dans chaque cas les gènes induits et les gènes réprimés. Le contraste utilisé à cette étape emploie l’ensemble des 4741 gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition comme background. Ceci permet de capturer les termes enrichis dans le contexte d’une interaction croisée particulière comparée à ceux enrichis dans le contexte d’un effet quelconque. De façon frappante, le contenu en gènes dans ces quatre catégories sous-tend des processus biologiques contrastés.

6.2.2.1 Gènes “antagonisés”

Gènes dont la répression T_3 -dépendante est antagonisée par la CORT

Dans cette catégorie, le contenu en gène ne semble pas enrichi de façon dramatique en une fonction biologique particulière, malgré la participation de AADAC (arylacétamide déacetylase) et PNPLA2 (phospholipase à domaine patatine, “patatin-like phospholipase domain”) au métabolisme des tri-glycérides (Figure 6.4, $p = 2,05 * 10^{-4}$ pour les deux termes).

Gènes dont l’induction T_3 -dépendante est antagonisée par les CORT

Cette catégorie non plus ne présente pas d’enrichissement fonctionnel fort. MCM4 (composant 4 du complexe de maintenance du minichromosome, “minichromosome maintenance complex component 4”), MCM2 (composant 2 du complexe de maintenance du minichromosome, “minichromosome maintenance complex component 2”) et LIG1 (ligase 1) participent cependant à la légère sur-représentation du contrôle de la réplication de l’ADN (Figure 6.5, $p = 3,36 * 10^{-5}$; $p = 4,35 * 10^{-5}$; $p = 4,53 * 10^{-4}$ pour les trois termes).

organic acid metabolic process (404)	carboxylic acid metabolic process (392)	small molecule biosynthetic process (270)	alcohol biosynthetic process (3)	organic hydroxy compound biosynthetic process (4)	cellular protein metabolic process (434)	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator (1)	positive regulation of cell cycle arrest (1)	negative regulation of protein ubiquitination (1)	single-organism carbohydrate metabolic process (163)	protein N-linked glycosylation via asparagine (1)
		carbohydrate derivative biosynthetic process (189)	organic substance biosynthetic process (1447)	steroid metabolic process (3)		signal transduction involved in cell cycle (1)	establishment of protein localization to membrane (1)	signal transduction in response to DNA damage (1)	single-organism carbohydrate metabolic process (79)	fructose 1,6-bisphosphate phosphorylation process (1)
	lipid biosynthetic process (lipid biosynthesis) (148)	amino acid activation (49)	organophosphate biosynthetic process (225)	sterol metabolic process (1)	intracellular protein transport (239)	translational elongation (40)	protein folding (41)	ER-nucleus signaling pathway (1)	carbohydrate catabolic process (62)	cellular carbohydrate metabolic process (73)
		lipid metabolic process (148)	ribonucleoside biosynthetic process (83)	glycosyl compound biosynthetic process (85)			intracellular protein transport (29)	translational initiation (16)	vesicle coating (1)	cellular protein modification process (142)
protein metabolic process (621)	rRNA metabolic process (34)	cellular macromolecule catabolic process (29)	cellular component disassembly (14)	gene expression (856)	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I (1)	antigen processing and presentation of exogenous antigen peptide antigen (1)	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I (1)	metabolic process metabolism (3702)	cellular metabolic cellular metabolism process (2710)	single-organism metabolism (467)
	organic substance catabolic process (385)	cellular macromolecule metabolic process (1445)	positive regulation of nuclease activity (1)	mRNA metabolic process (31)	regulation of cellular amino acid metabolic process (1)	antigen processing and presentation of exogenous antigen peptide antigen (2)	primary metabolic process primary metabolism (2495)			
ncRNA metabolic process (151)	rRNA processing (34)	ribonucleoprotein complex biogenesis (46)	organonitrogen compound metabolic process (817)	regulation of ligase activity (1)	organic substance metabolic process organic substance metabolism (2694)	primary metabolic process primary metabolism (2495)	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism viral transcription (1)	catabolic process catabolism (405)	biosynthetic process biosynthesis (1515)	
		translational termination (9)	regulation of cellular amine metabolic process (1)	RNA processing (133)						

FIGURE 6.3 – Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans les bourgeons de pattes postérieures. L'enrichissement de catégories fonctionnelles obtenu Figure 6.2 a subi un post-traitement à l'aide de REVIGO (Supek *et al.*, 2011) afin de résumer les différentes catégories avec une granularité moindre (deux niveaux) et de les représenter sous forme de "treemap". La taille des rectangles est proportionnelle à la signification de l'enrichissement de la catégorie fonctionnelle associée. Le nombre de gènes associé à chaque catégorie est indiqué dans chaque cadre. Un gène pouvant être associé à plusieurs catégories, le total du nombre de gènes indiqué dans chaque case est supérieur au nombre de gènes utilisés en entrée.

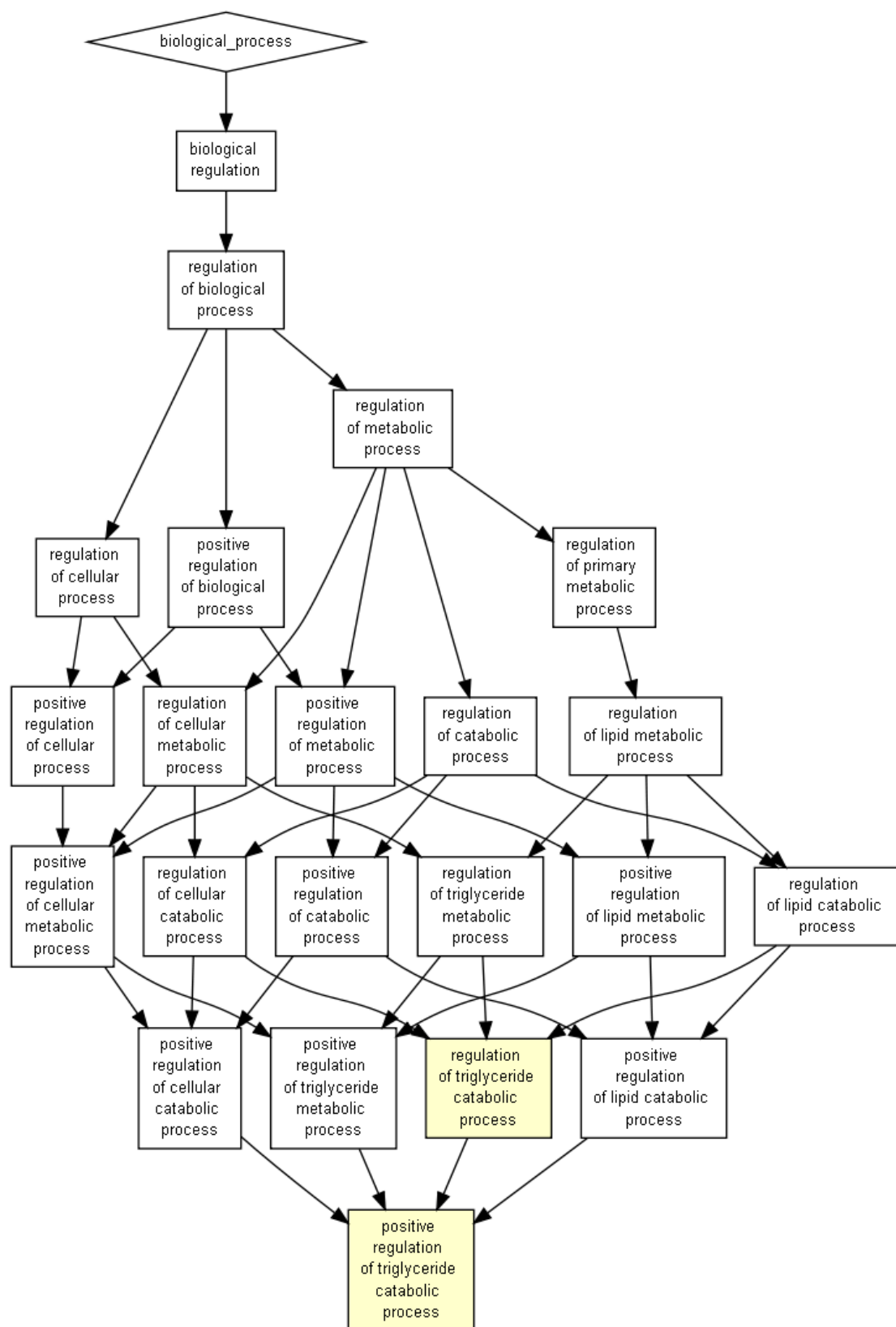


FIGURE 6.4 – Termes enrichis parmi les fonctions biologiques associées aux gènes réprimés par la T₃ dans les clusters antagonistes. Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l'enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$ Jaune : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$ Orange : $10^{-9} \leq p < 10^{-7}$ Rouge : $p < 10^{-9}$

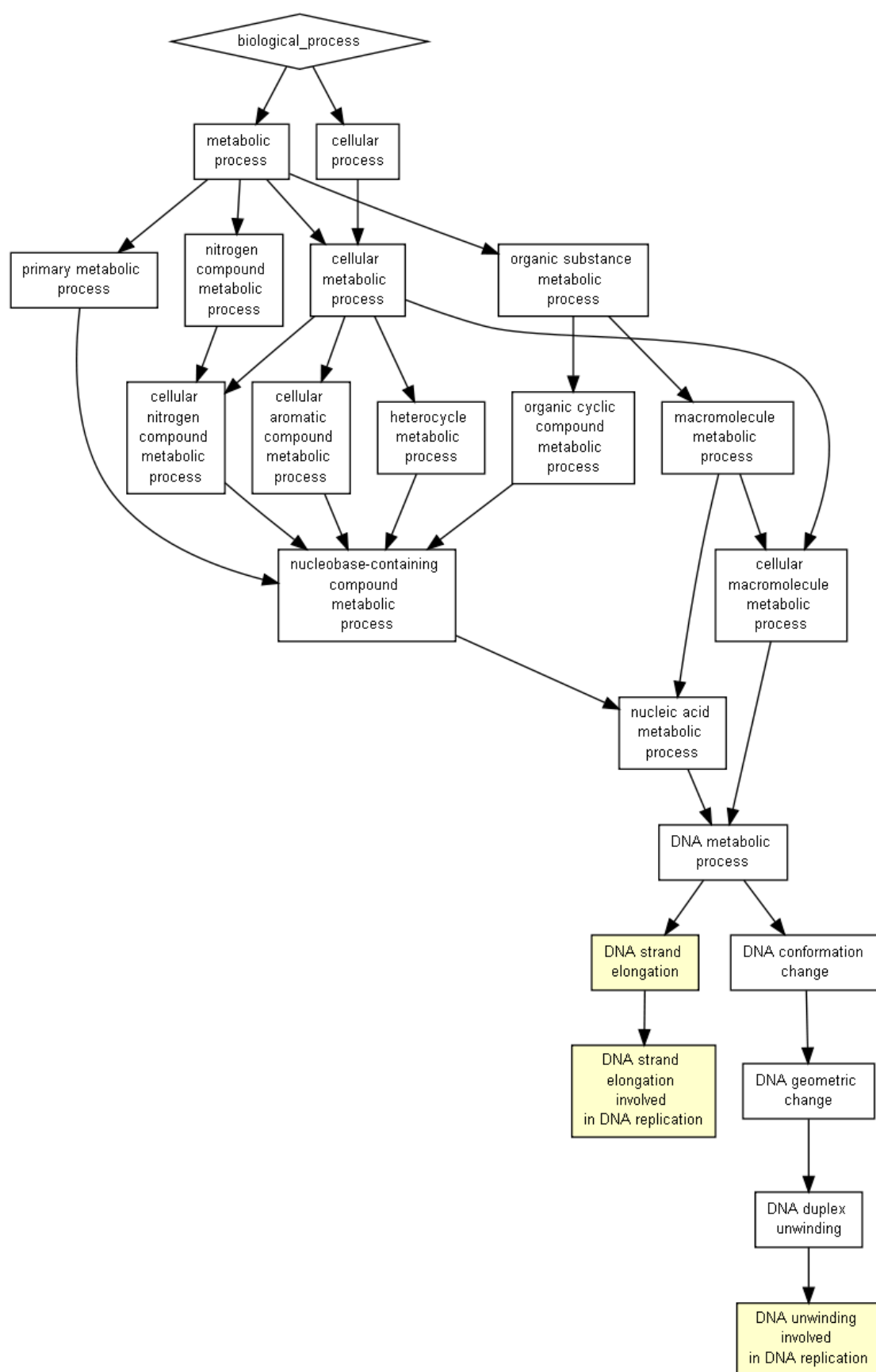


FIGURE 6.5 – (Page précédente) Termes enrichis parmi les fonctions biologiques associées aux gènes induits par la T_3 dans les clusters “antagonistes”. Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l’enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$ Jaune : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$ Orange : $10^{-9} \leq p < 10^{-7}$ Rouge : $p < 10^{-9}$

6.2.2.2 Gènes “potentiés”

Gènes dont l’effet inducteur de la T_3 est potentialisé par la CORT La seule catégorie fonctionnelle enrichie dans ce sous-ensemble de gènes correspond au développement de l’épiderme (Figure 6.6 ; gènes BNC1 (protéine à doigt de zinc basonucléine-1, “zinc finger protein basonuclin-1”), ZNF750 (protéine à doigt de zinc 750, “zinc finger protein 750”), KRT17 (keratine 17), LAMB3 (laminine $\beta 3$) et SCEL (scieline)).

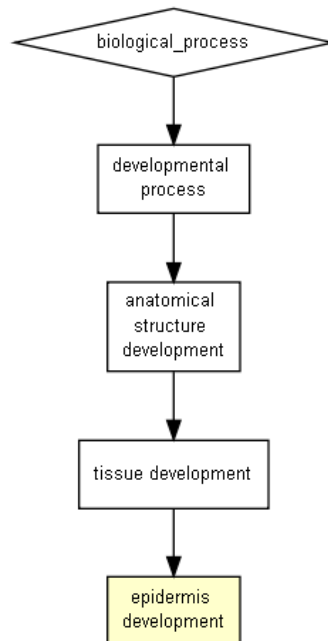


FIGURE 6.6 – Enrichissement fonctionnel des gènes dont l’induction T_3 -dépendante est potentialisée par la CORT Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l’enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$

Gènes dont l’effet répresseur de la T_3 est réprimé par la CORT Enfin, cette catégorie est fortement enrichie en termes associés au système immunitaire, et en particulier à la signalisation à la réponse aux cytokines dans deux contextes :

- la régulation du devenir cellulaire (différentiation, activation des macrophages, Figure 6.7 partie 1/4)

— la signalisation INF γ (interféron γ) (Figure 6.7 partie 3/4)

Parmi les gènes participant à la sur-représentation du système immunitaire, nous trouvons notamment les orthologues de IRF-7 (facteur de régulation des interférons 7, “interferon regulatory factor 7”), VCAM-1 (molécule 1 d’adhésion des cellules vasculaires, “vascular cell adhesion molecule 1”), CD40 (CD40, membre 5 de la superfamille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale, “CD40, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5”) ou encore NCF-1 (facteur cytosolique 1 des neutrophiles, “neutrophil cytosolic factor 1”), et de plusieurs composants du MHC (complexe majeur d’histocompatibilité), tous participant à la réponse immunitaire innée et l’activation des macrophages.

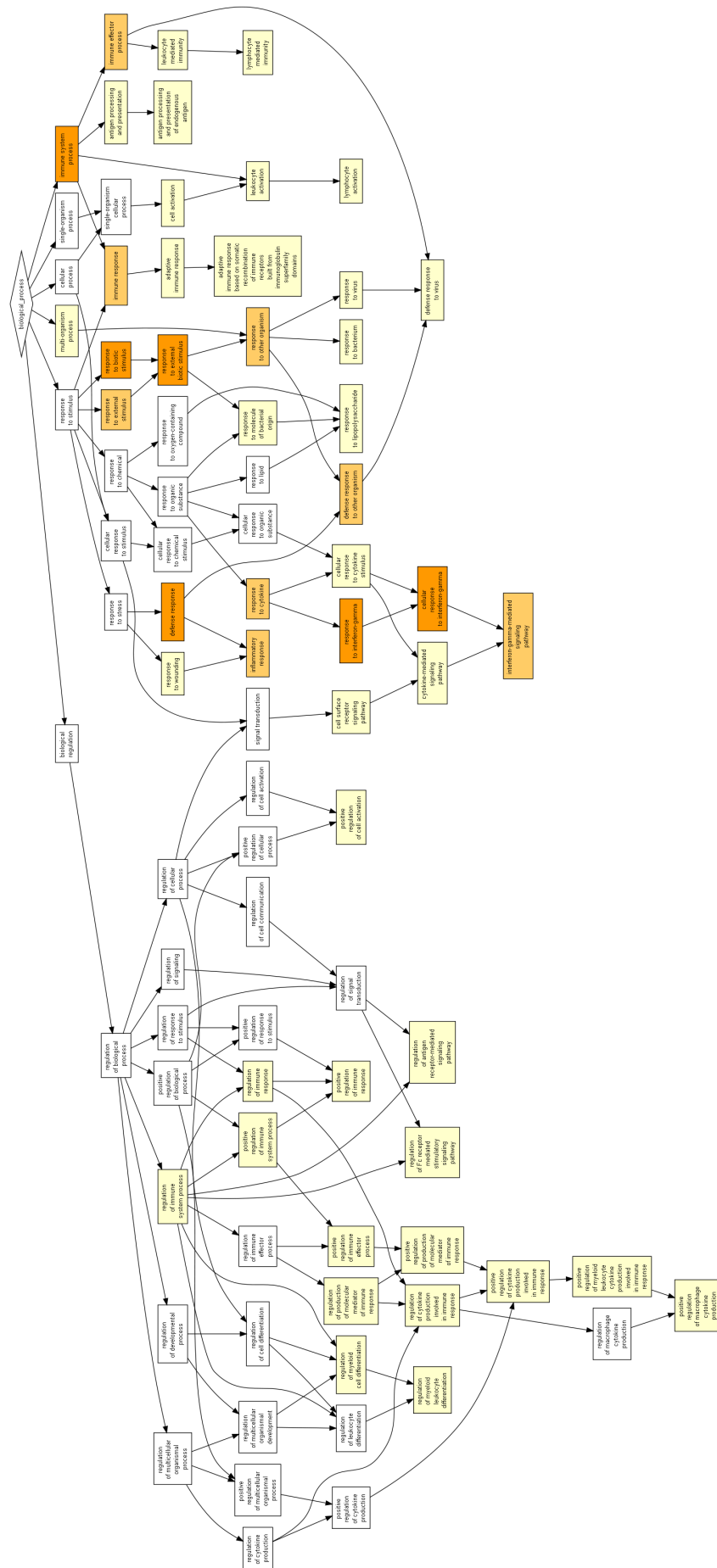
6.3 Curation manuelle des termes

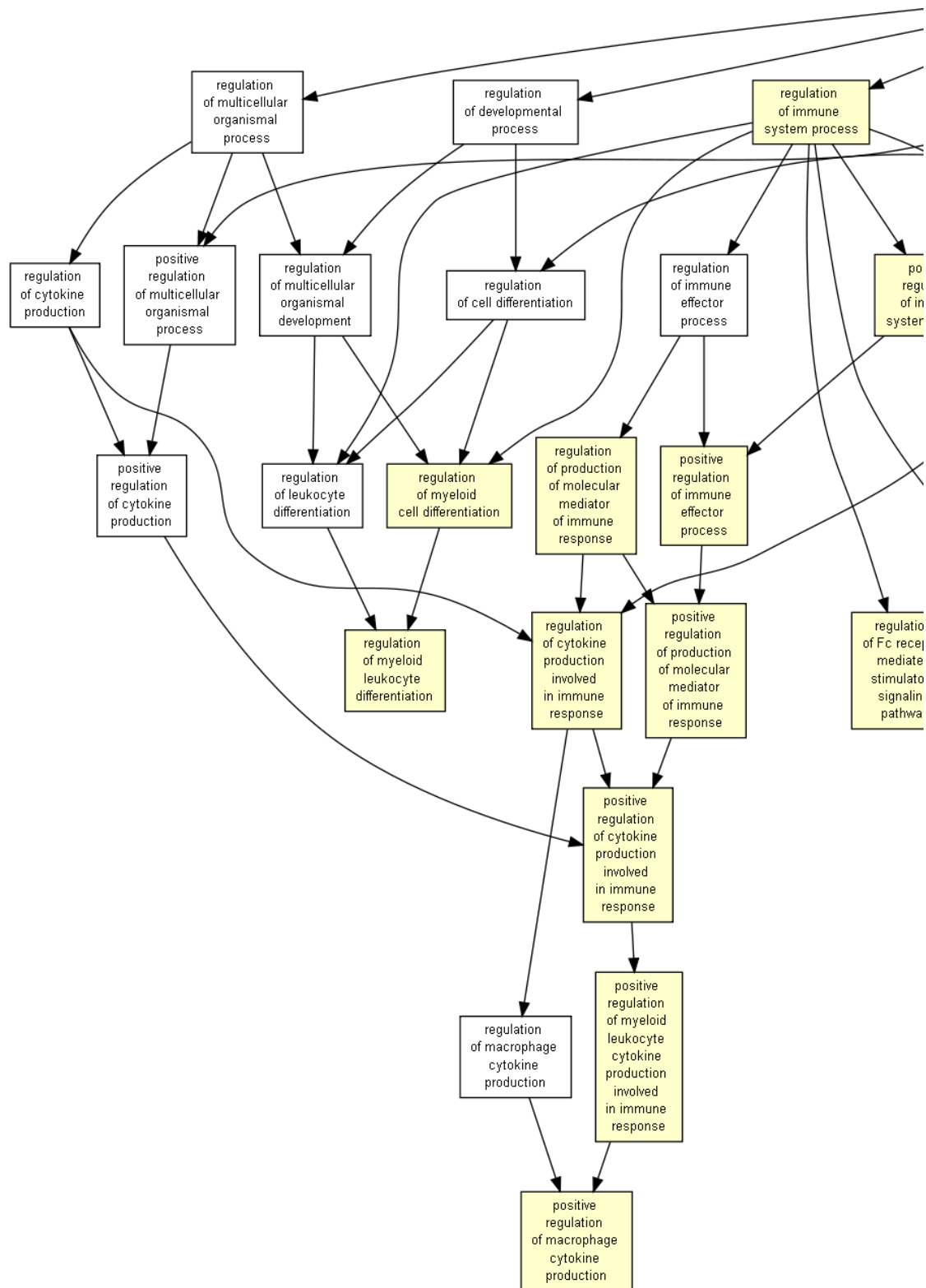
L’analyse automatique réalisée ci-dessus n’a pas permis de mettre en évidence de termes GO particulièrement enrichis, pour chacun des types de profil d’expression (excepté pour les gènes réprimés et dont l’effet des HTs est potentié par les GCs). De plus, j’ai pu observer un enrichissement, modéré à fort, de termes généraux liés au système immunitaire. Par conséquent, j’ai complété cette analyse par une recherche manuelle des termes fonctionnels comme décrit sous-section 5.4.2

Les résultats sont représentés sous forme d’un double histogramme vertical à deux composantes qui permet de comparer visuellement l’enrichissement des termes fonctionnels de deux groupes de gènes. Chaque barre est d’autant plus longue (vers la droite où la gauche) que les termes correspondants sont retrouvés dans l’une ou l’autre des listes de gènes. De plus, un calcul simple ($\frac{N_i}{\sum_i N_i}$ avec N_i =nombre de gènes dans le groupe i) permet d’estimer la répartition du nombre de gène entre les deux groupes. Ce dernier est représenté par un trait rouge. Par conséquent, toute déviation par rapport à la ligne rouge illustre un enrichissement ou une déplétion dans le terme correspondant.

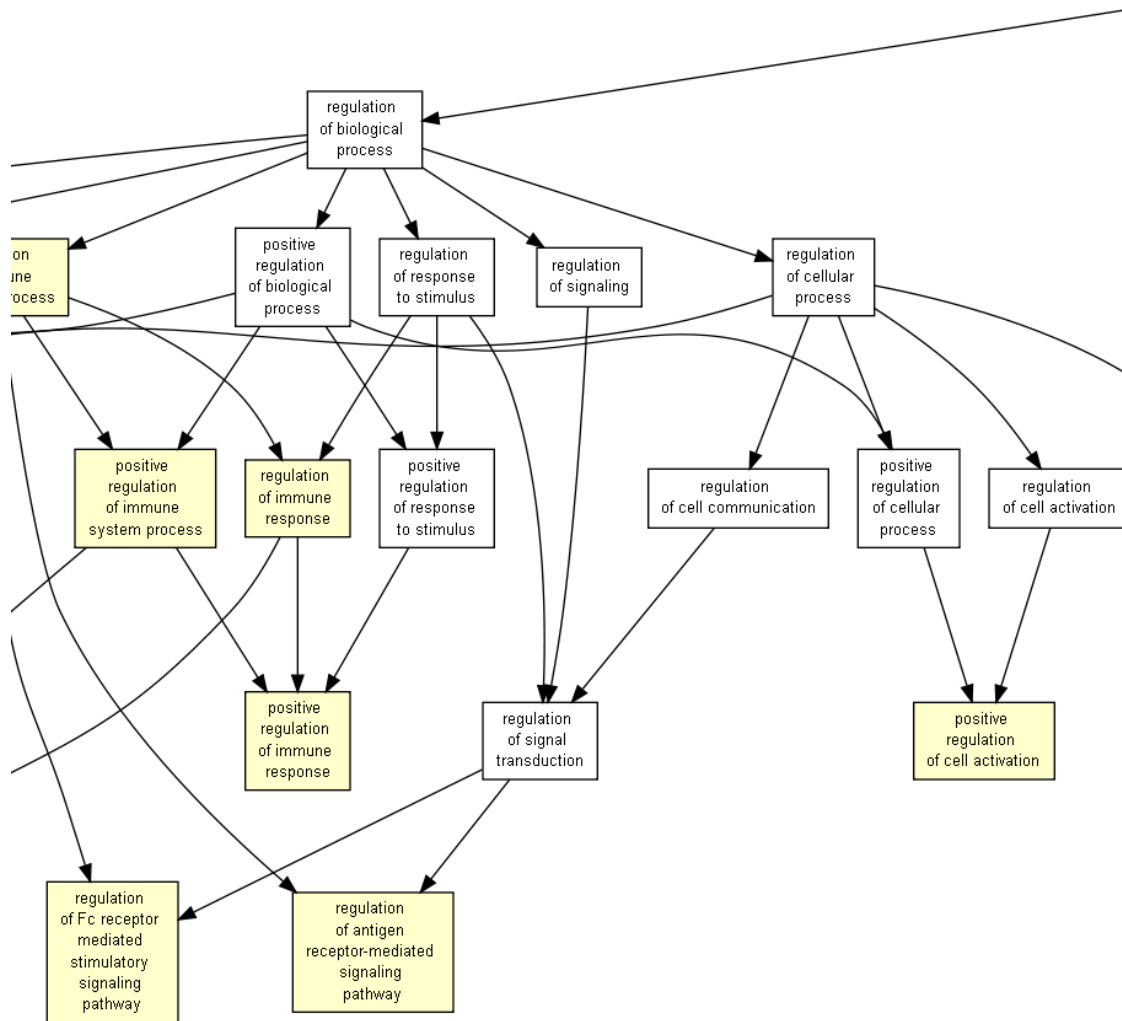
Cette représentation (Figure 6.8) apporte quelques points à l’analyse de la Figure 3A de l’article :

- Le terme lié aux maladies auto-immunes (“autoimmune”) sont enrichis pour les gènes “potentiés” et absents des gènes “antagonisés”.

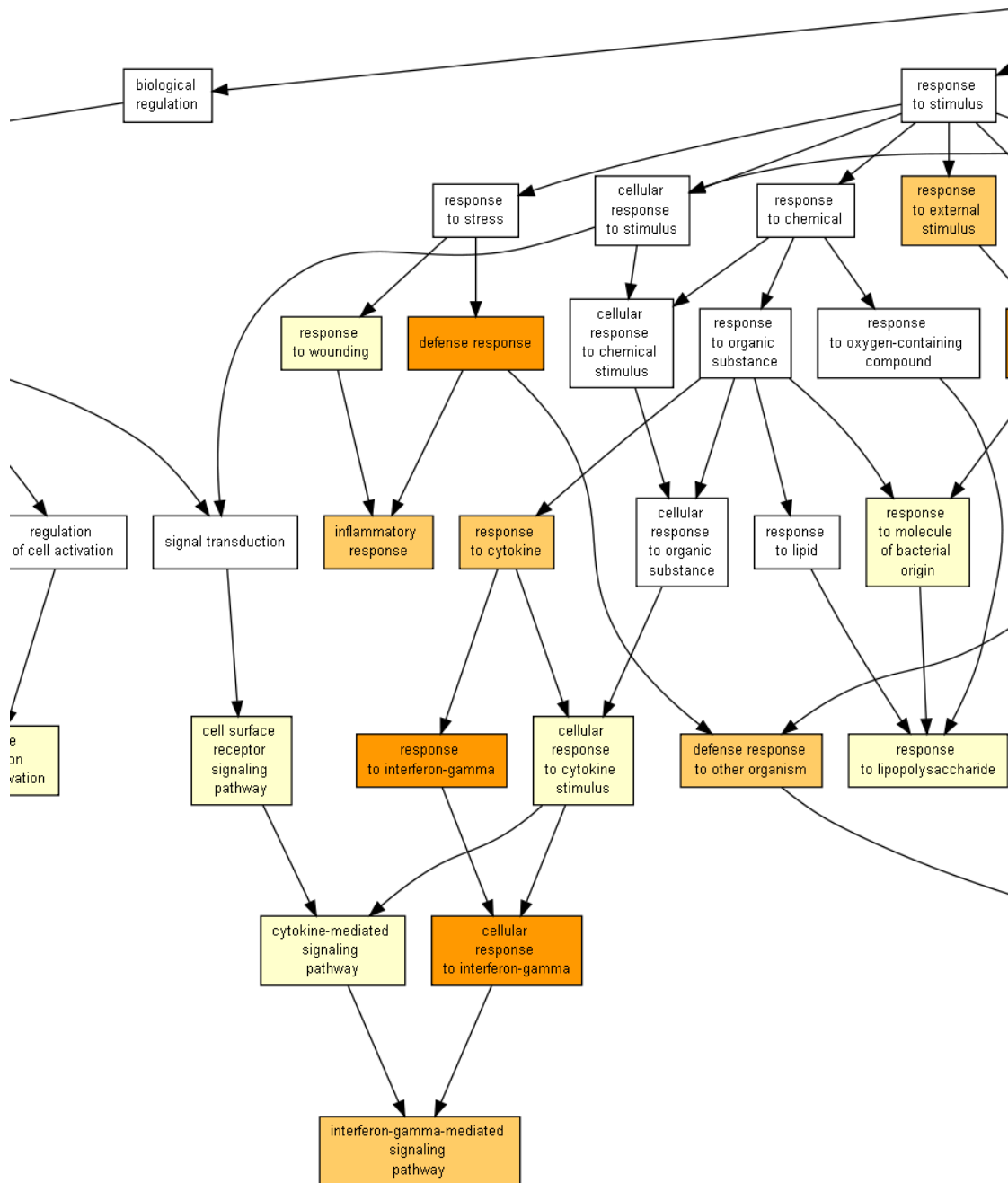




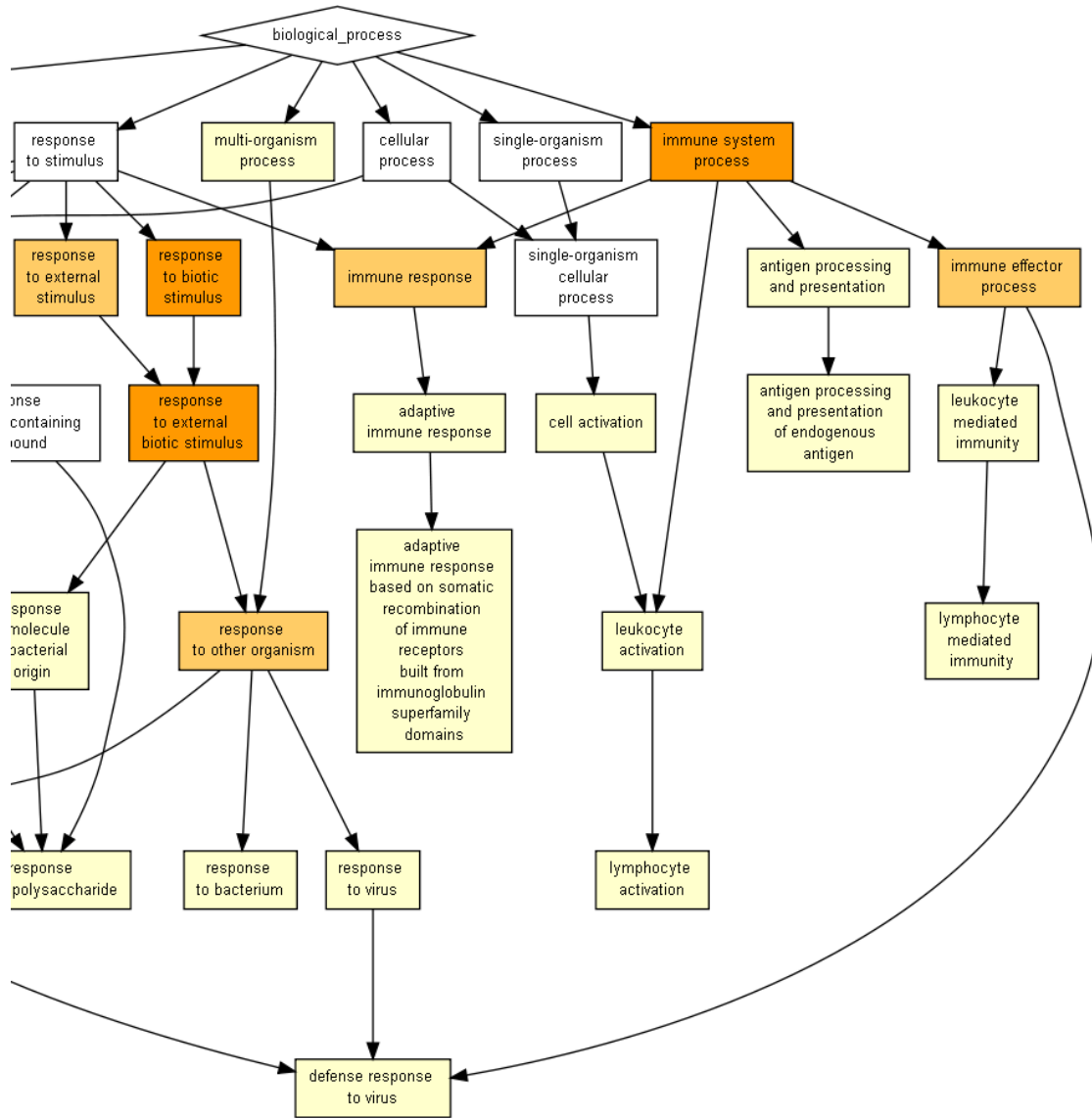
(b) 1/4



(c) 2/4



(d) 3/4



(e) 4/4

FIGURE 6.7 – (Cinq pages précédentes) Enrichissement fonctionnel des gènes dont la répression T₃-dépendante est potentiée par la CORT a) Vue générale b) Détail L'enrichissement des termes comparé à l'ensemble des gènes transcrits est calculé à l'aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l'enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$ Jaune : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$ Orange : $10^{-9} \leq p < 10^{-7}$ Rouge : $p < 10^{-9}$

- Les termes liés aux pathologies osseuses sont eux aussi contrastés : les termes liés à la poly-arthrite rhumatoïde (“rhumatoid arthritis”) est enrichi dans les gènes “potentiés” et sous-représentés dans les gènes “antagonisés”. Le terme ostéoarthrite (“osteoarthritis”) suit une tendance inverse.
- Les termes liés à la physiologie de l’os (“bone”, “cartilage”, “joints”) sont légèrement sur-représentés dans les gènes “antagonisés”.

Pour analyser plus finement les fonctions biologiques associées aux profils “d’antagonisme”, j’ai représenté sous forme de double-histogramme vertical les effectifs des gènes réprimés (à gauche) ou induits (à droite) associés à différentes fonctions biologiques (Figure 6.9). Il y a une asymétrie forte pour les gènes associés à l’ostéoarthrite. Il sont en effet enrichis en gènes dont l’induction T_3 -dépendante est antagonisée par la CORT

L’analyse des gènes “potentiés” révèle une situation contrastée Figure 6.10 pour les termes liés à l’inflammation (“inflammation”), peau (“skin”) et le système vasculaire (“vascular”).

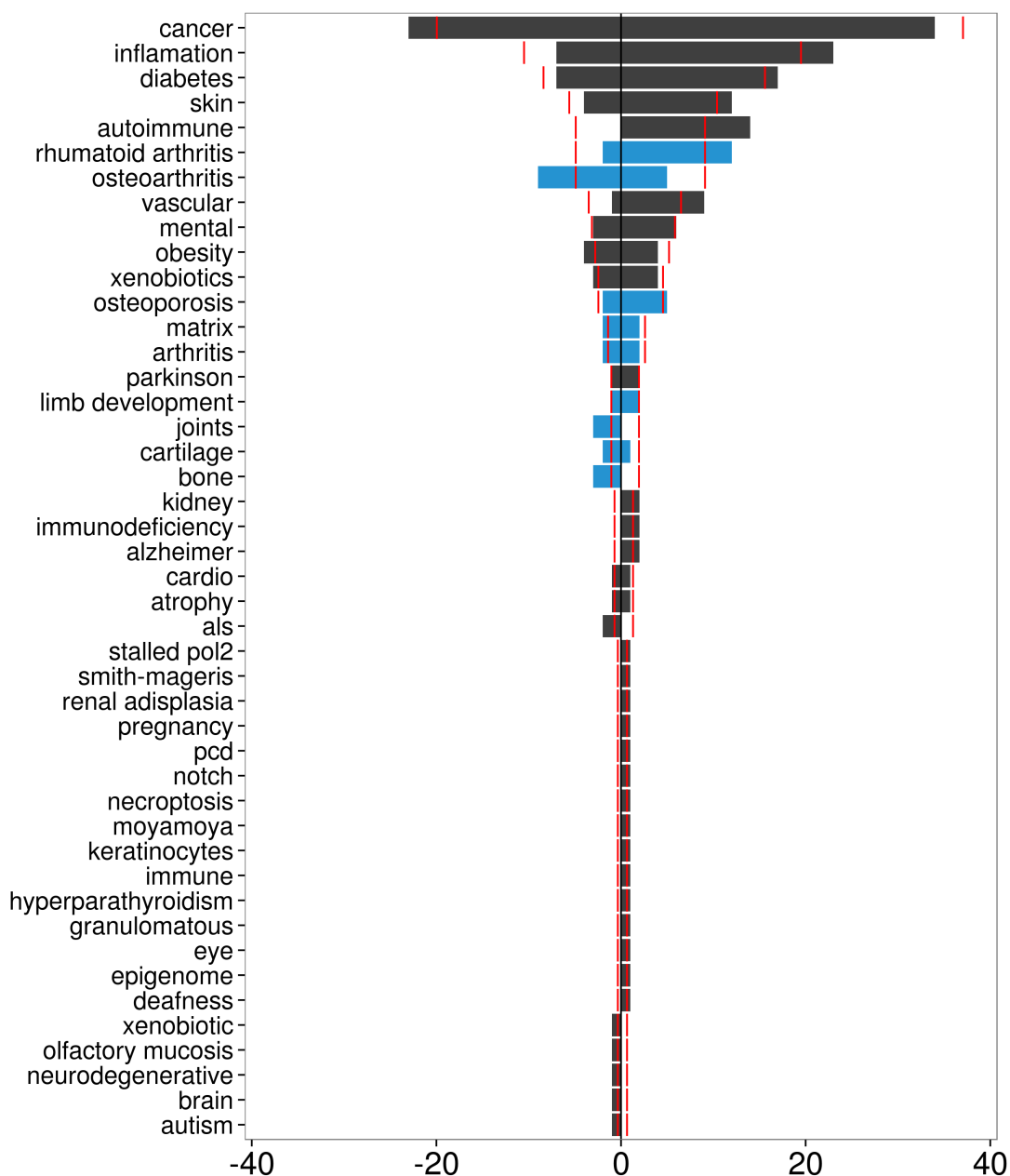


FIGURE 6.8 – Termes enrichis dans les catégories de gènes “antagonisés” (valeurs négatives à gauche) et “potentiés” (valeurs positives à droite) dans les HLBs. La valeur absolue de l’axe des abscisses représente le nombre de gènes associés à chaque terme (axe des ordonnées). Seuls les 50 termes les plus représentés sont illustrés ici. Les barres verticales rouge correspondent au nombre théorique de gènes associés à chaque terme dans le cas d’une répartition aléatoire entre profils “antagonisés” et “potentiés”. Les termes bleus sont associés au squelette.

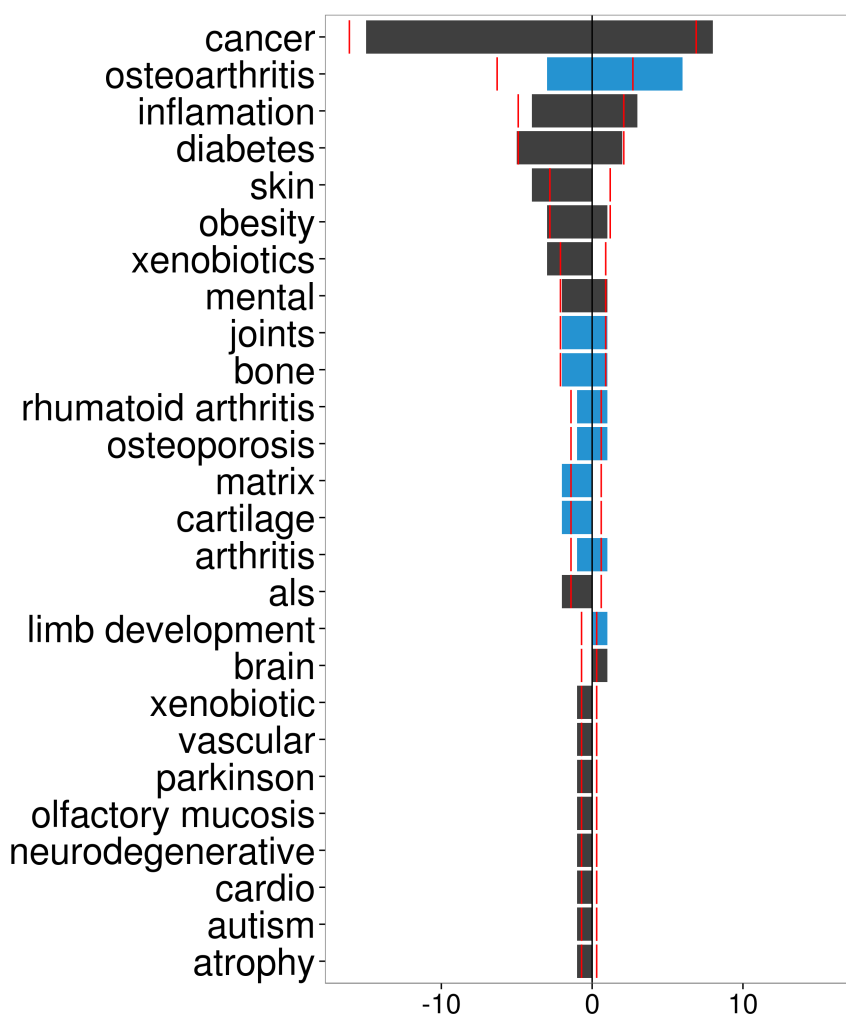


FIGURE 6.9 – Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes présentant un profil d’“antagonisme” et réprimés (valeurs négatives, partie gauche) ou induits (valeurs positives, partie droite) dans les HLBs. La valeur absolue de l’axe des abscisses représente le nombre de gènes associés à chaque terme (axe des ordonnées). Les barres verticales rouge correspondent au nombre théorique de gènes associés à chaque terme dans le cas d’une répartition aléatoire entre répression et induction. Les termes bleus sont associés au squelette.

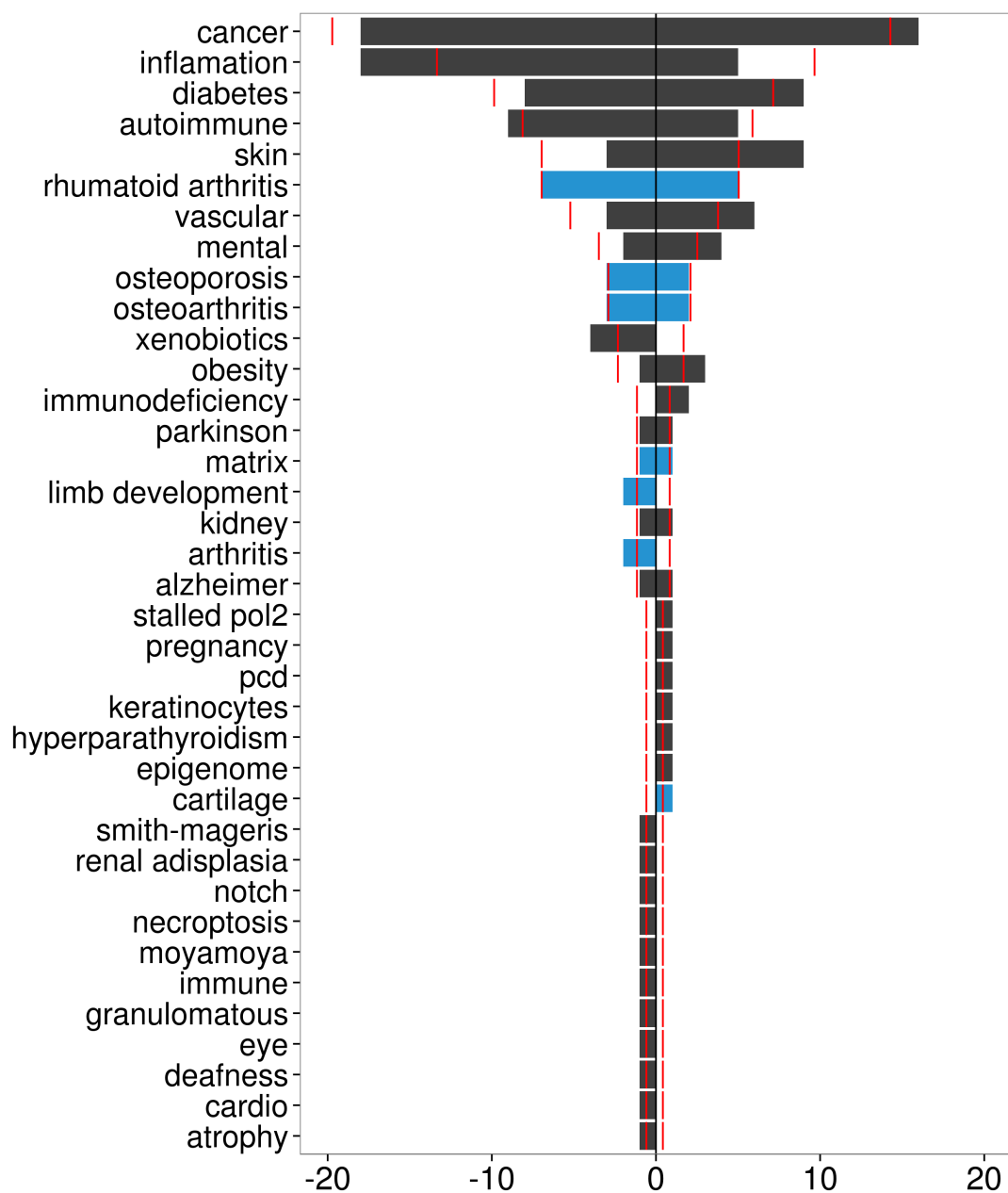


FIGURE 6.10 – Termes enrichis dans les catégories de “potentiation” entre les effets des deux hormones dans les HLBs. Les valeurs négatives (partie gauche) correspondent à une potentiation de l’effet répresseur des hormones. Les valeurs positives (partie droite) correspondent à une potentiation de l’effet inducteur des hormones. La valeur absolue de l’axe des abscisses représente le nombre de gènes associés à chaque terme (axe des ordonnées). Les barres verticales rouges correspondent au nombre théorique de gènes associés à chaque terme dans le cas d’une répartition aléatoire entre répression et induction. Les termes bleus sont associés au squelette.

Caractérisation des interactions croisées entre hormones thyroïdiennes et glucocorticoïdes dans l'épiderme caudal

7.1 Caractéristiques générales

De même que pour les HLBs, je me suis intéressé aux différents types de réponses transcriptionnelles suite à un stimulus par les HTs et / ou les GCs dans l'épiderme caudal. L'épiderme caudal a été prélevé sur des culture organotypiques de queues de têtards de *X. tropicalis* stade NF 54 traitées aux HTs et / ou aux GCs comme décrit dans la section 5.1.

L'analyse différentielle conduite telle que décrite à la sous-section 5.3.5 révèle que les niveaux de transcrits de 1363 gènes sont affectés par au moins l'un des trois traitements hormonaux. Parmi eux, 303 sont régulés par la T_3 , 343 par la CORT et 1164 par un co-traitement. Par ailleurs, l'amplitude des facteurs d'induction (exprimée en $\log_2$ dans la suite du paragraphe) est relativement homogène à travers les trois traitement (Figure 7.1) : dans la condition T_3 , elle varie entre -2.75 et 7.065 ; 68 gènes sont réprimés tandis que 235 sont induits. Dans la condition CORT, elle varie entre -3.53 et 6.48 ; 199 gènes sont réprimés alors que 143 sont induits. Enfin, dans le cas du co-traitement, les facteurs d'induction varient entre -5.71 et

7.90; la quantité de transcrits de 654 gènes est diminuée tandis que pour 509 gènes, la quantité de transcrits est augmentée.

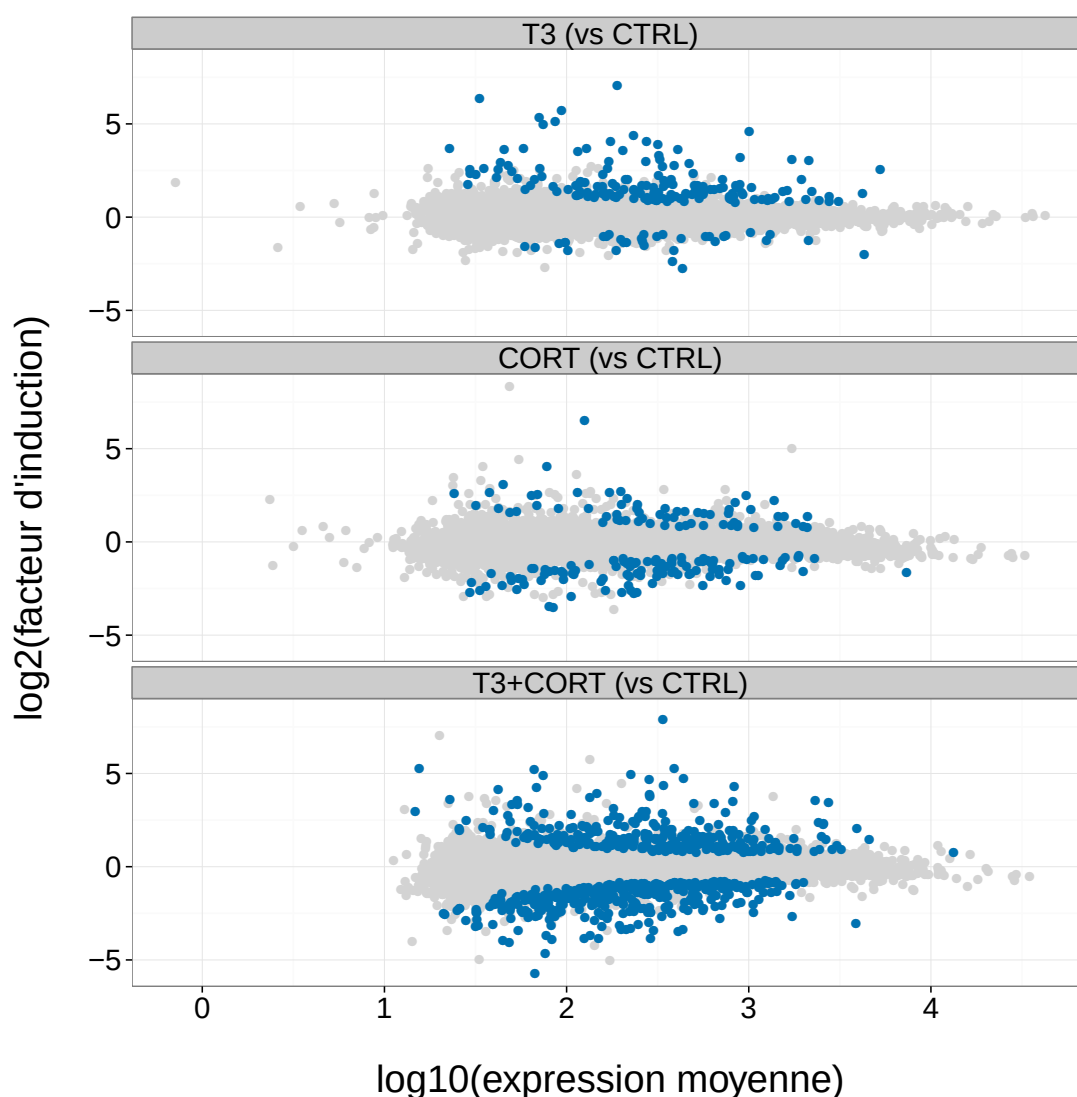


FIGURE 7.1 – MA plot des gènes exprimés dans l’épiderme caudal. Chaque gène est représenté par un point et positionné dans cette représentation en fonction de son expression moyenne (en $\log_{10}$) entre deux traitements (abscisses) et de son facteur d’induction en $\log_2$ (ordonnées). Les points colorés en bleu sont les gènes dont la différence d’expression est considérée comme significative par DESeq.

Contrairement à la réponse stéréotypée “HTs” dans les HLBs, les types de profils d’expression dans le TF sont beaucoup plus homogènes, avec seulement $\sim 1/4$ des gènes ne présentant qu’une réponse aux HTs (Figure 7.2). La majeure partie des profils d’expression des gènes différentiellement exprimés correspond ainsi à une interaction entre les deux voies de signalisation étudiées (1019 / 1363 gènes, $\sim 75\%$).

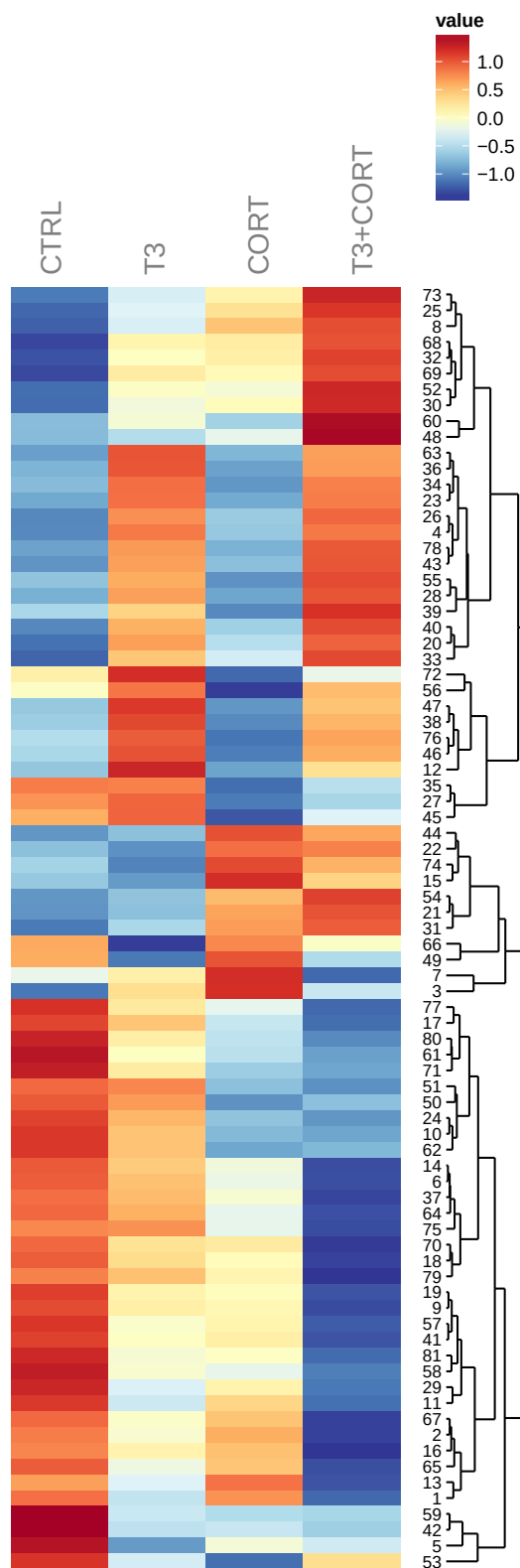


FIGURE 7.2 – Heatmap groupant 81 clusters de gènes ayant des profils d'expression similaires. Chaque ligne représente un cluster de gènes déterminé par "fuzzy c-mean clustering" (voir MM papier limb). Le niveau d'expression de chaque cluster est centré sur zéro, et la variance à travers les quatre traitements ajustée à un. Le dendrogramme et l'ordre des clusters est calculé sur la base de leur distance euclidienne. Les chiffres à gauche du dendrogramme correspondent aux numéros des clusters.

7.2 Annotation fonctionnelle automatisée

L'analyse automatisée des catégories fonctionnelle enrichies révèle une forte composante associée aux interactions physiques de cellule à cellule (jonction, adhésion, communication), à la matrice extra-cellulaire et à sa dégradation (Figure 7.3).

La représentation en “treemap” décrite précédemment récapitule les fonctions biologiques enrichies (Figure 7.4).

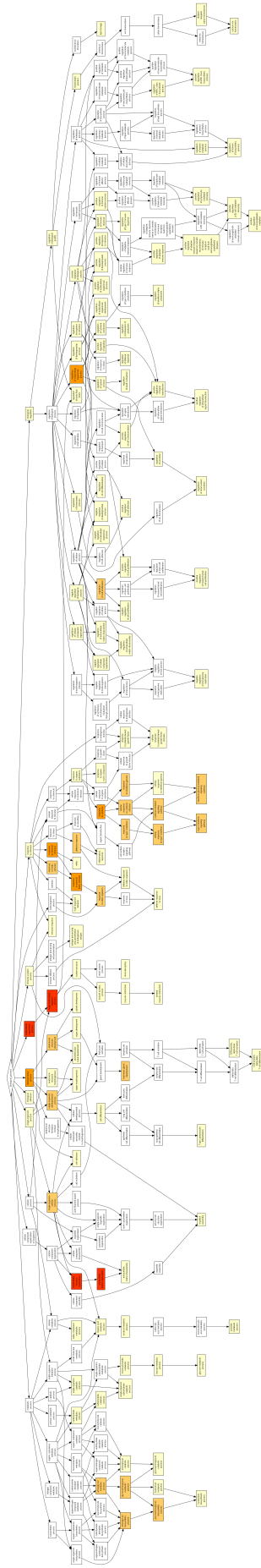
Au vu des données générées, les interactions entre signalisation HT et GC au niveau transcriptionnel se caractérisent, de façon similaire aux HLBs, par deux types de profils :

- Des profils type “potentiation”, où le traitement combiné des deux hormones se traduit par un effet plus marqué sur la quantité de transcrits des gènes cibles que lors d'un traitement par une des deux hormones seule.
- Des profils de type “antagonisme”, où l'effet d'une hormone est inhibé par la seconde.

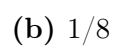
Peu de gènes présentent un profil d'expression “d'antagonisme” par rapport à un profil d'expression de type “potentié”, 129 et 747 respectivement. Les profils de type “potentiés” peuvent être catégorisés en une potentiation de l'effet répresseur (Figure 7.5 A) et de l'effet activateur (Figure 7.5 B). Les effets de type antagonistes sont marqués par la présence de “clusters” regroupant des gènes dont l'effet de la T_3 est inhibé par la CORT (Figure 7.6 A) et des gènes dont l'effet de la CORT est inhibé par celui de la T_3 (Figure 7.6 B).

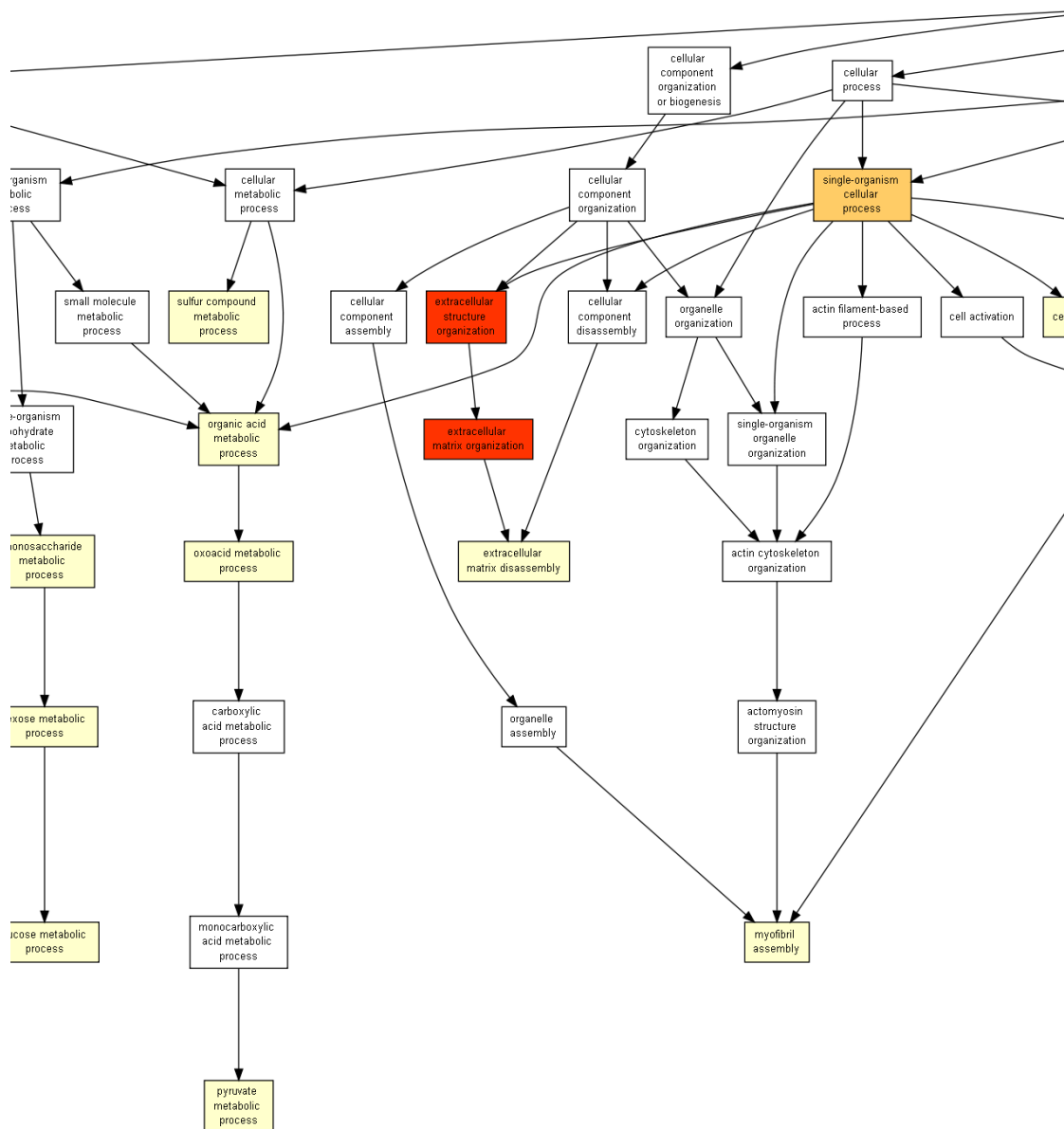
Pour mettre en évidence les catégories fonctionnelles spécifiques des différents types d'interactions croisées entre HTs et GCs, le “background” que j'ai utilisé a été constitué à partir de la liste des 1363 gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition. Les fonctions biologiques associées aux gènes réprimés parmi les gènes de type “potentiation” sont clairement associées à l'inhibition de prolifération cellulaire et à la réponse immunitaire Figure 7.7.

Les gènes dont la quantité de transcrits est augmentée de façon potentiée par le traitement combiné des deux hormones sont caractéristiques de fonctions biologiques liés au transport d'ions organiques et de molécules de petite taille.

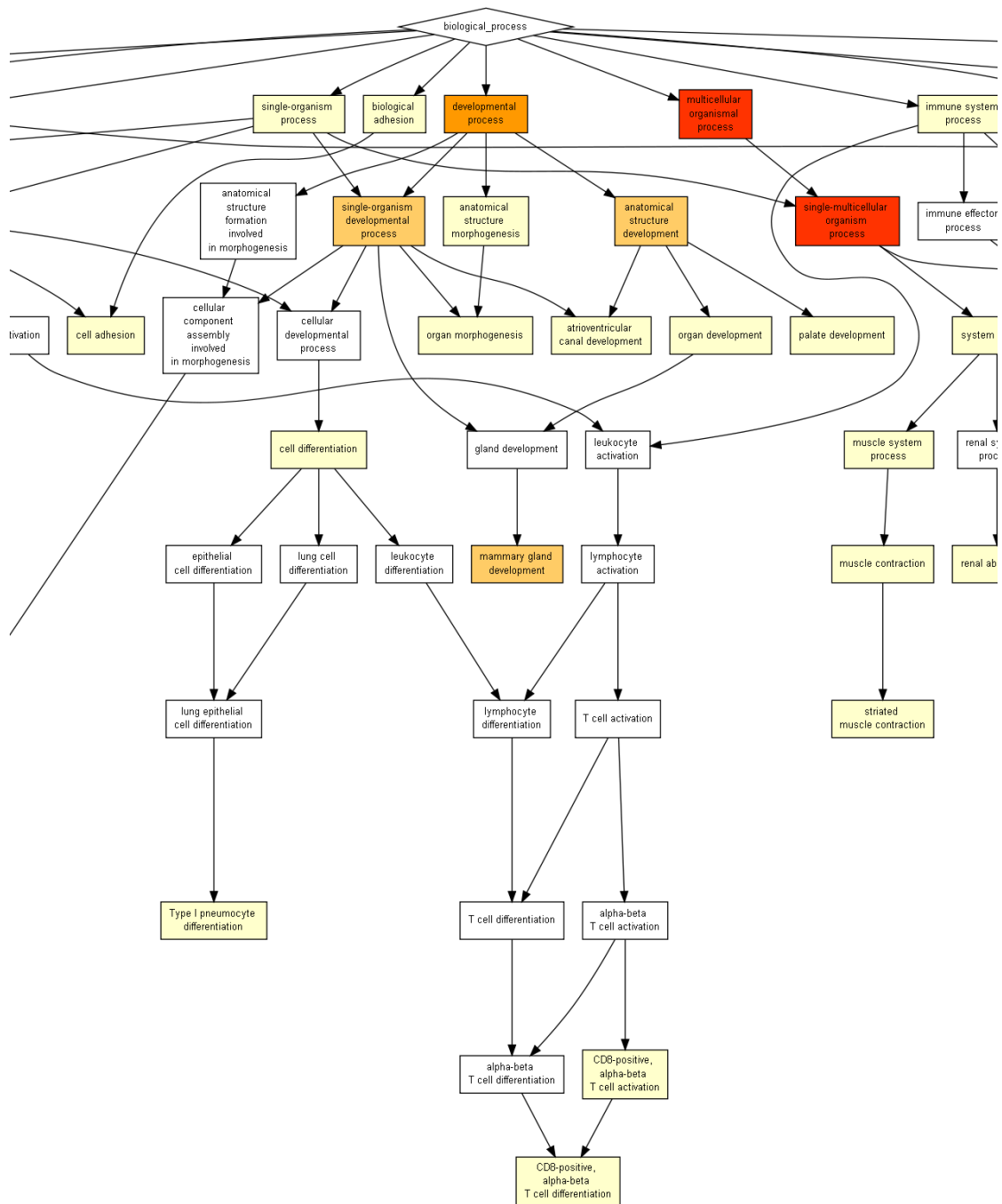


(a) Vue d'ensemble

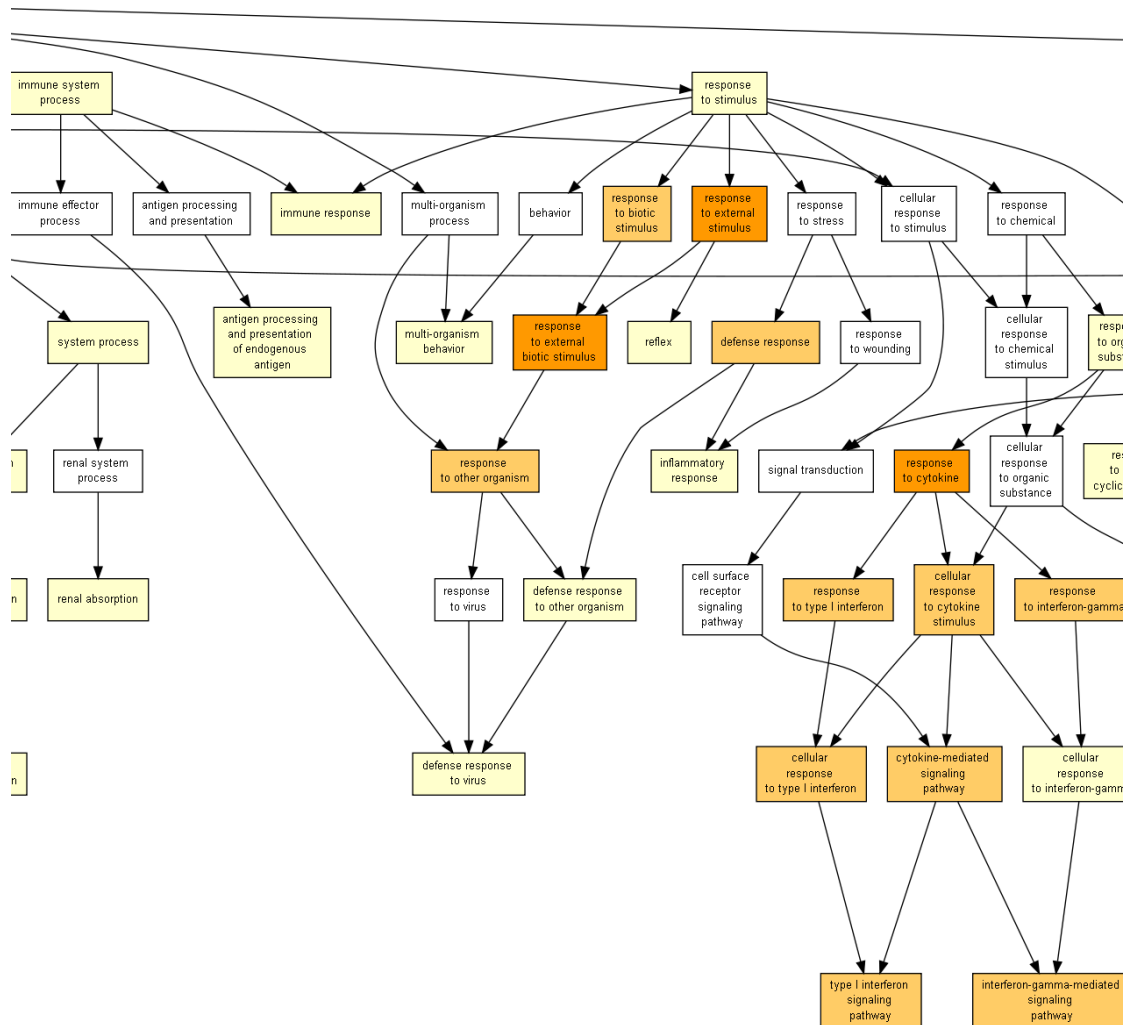




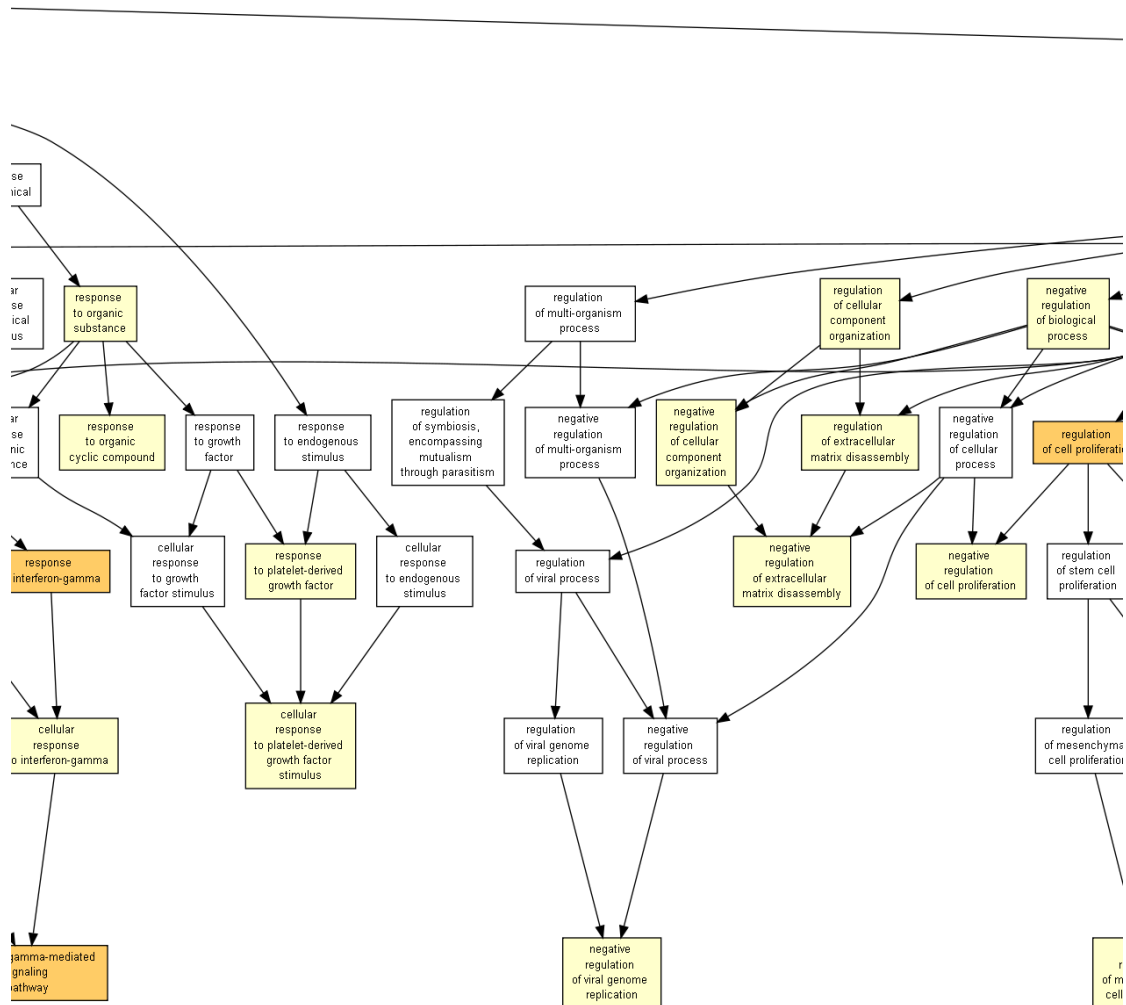
(c) 2/8



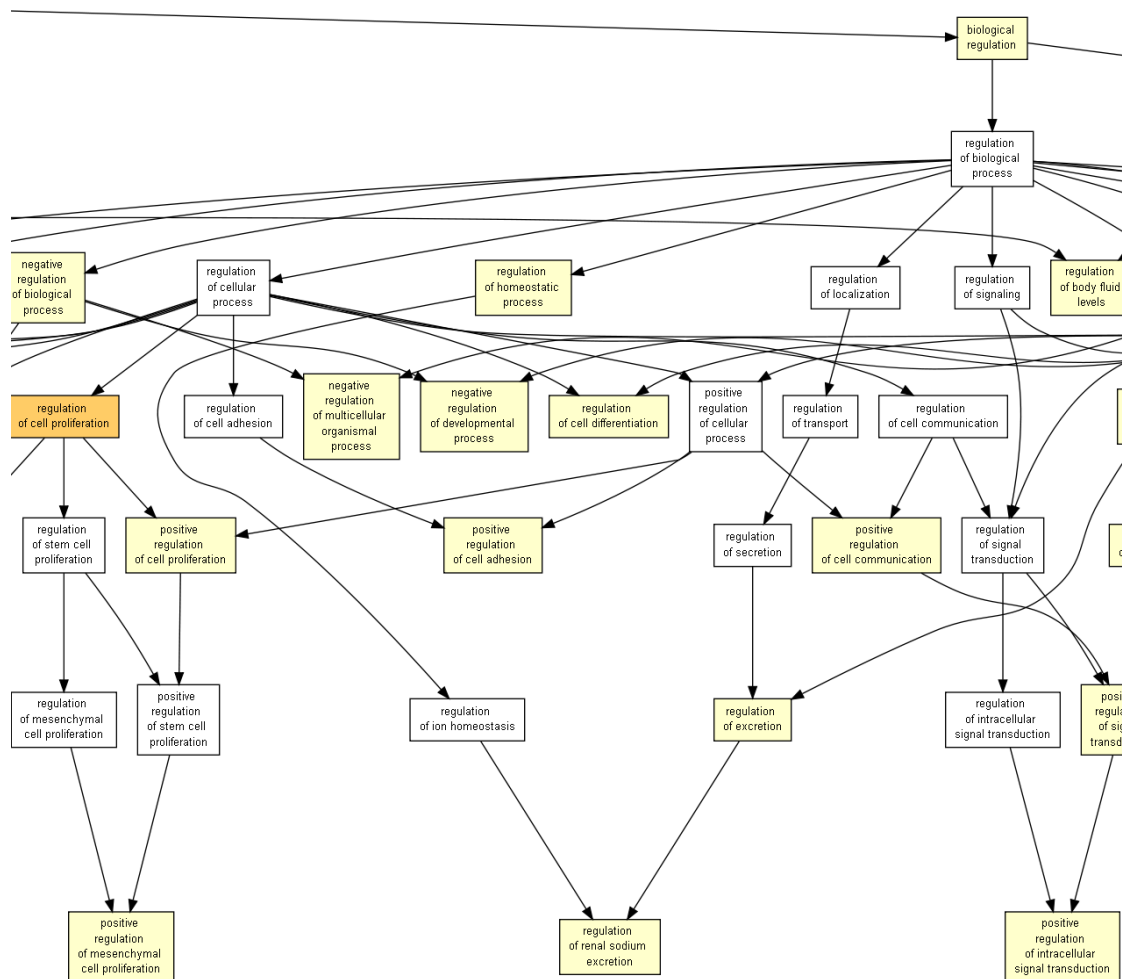
(d) 3/8



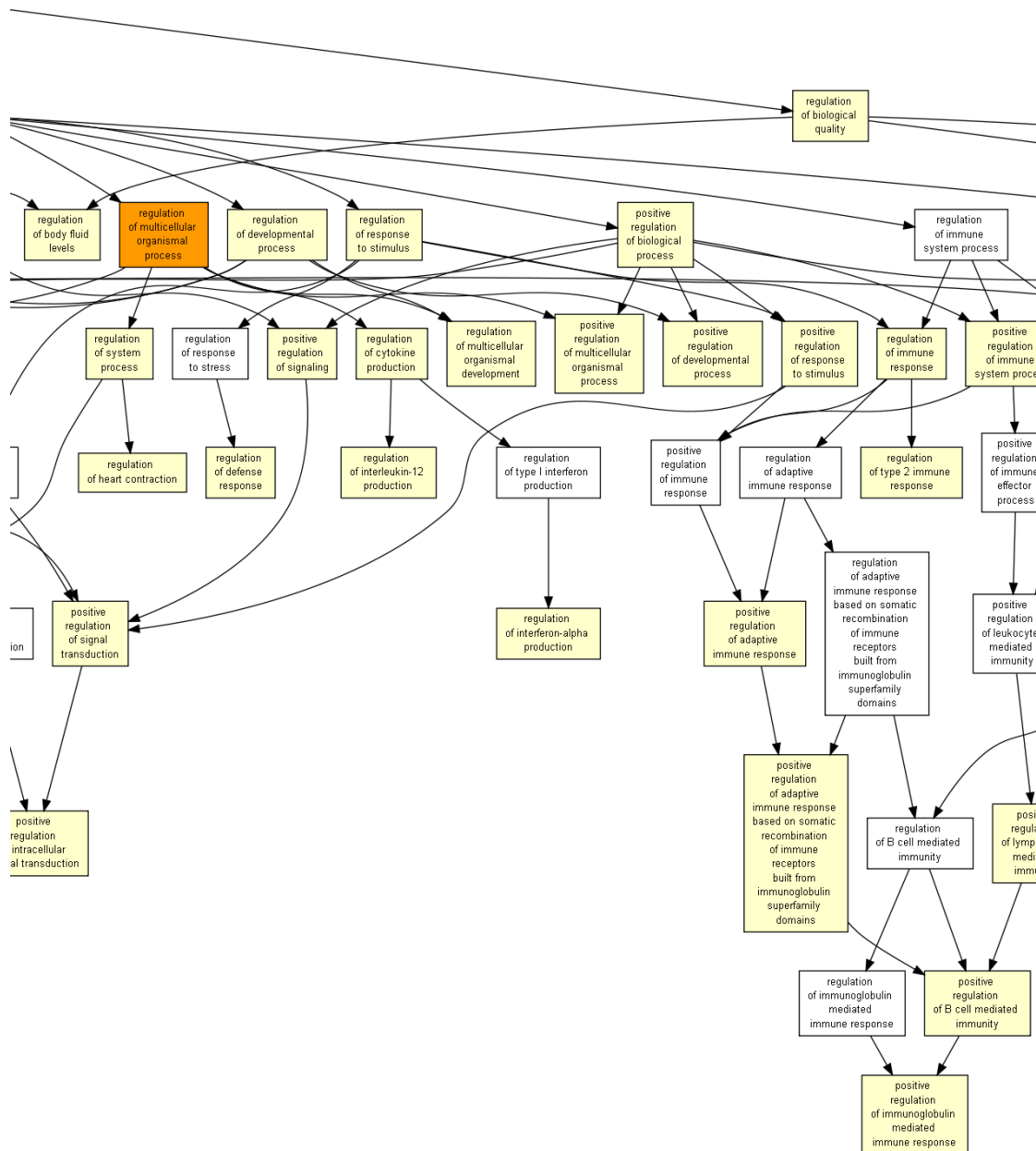
(e) 4/8



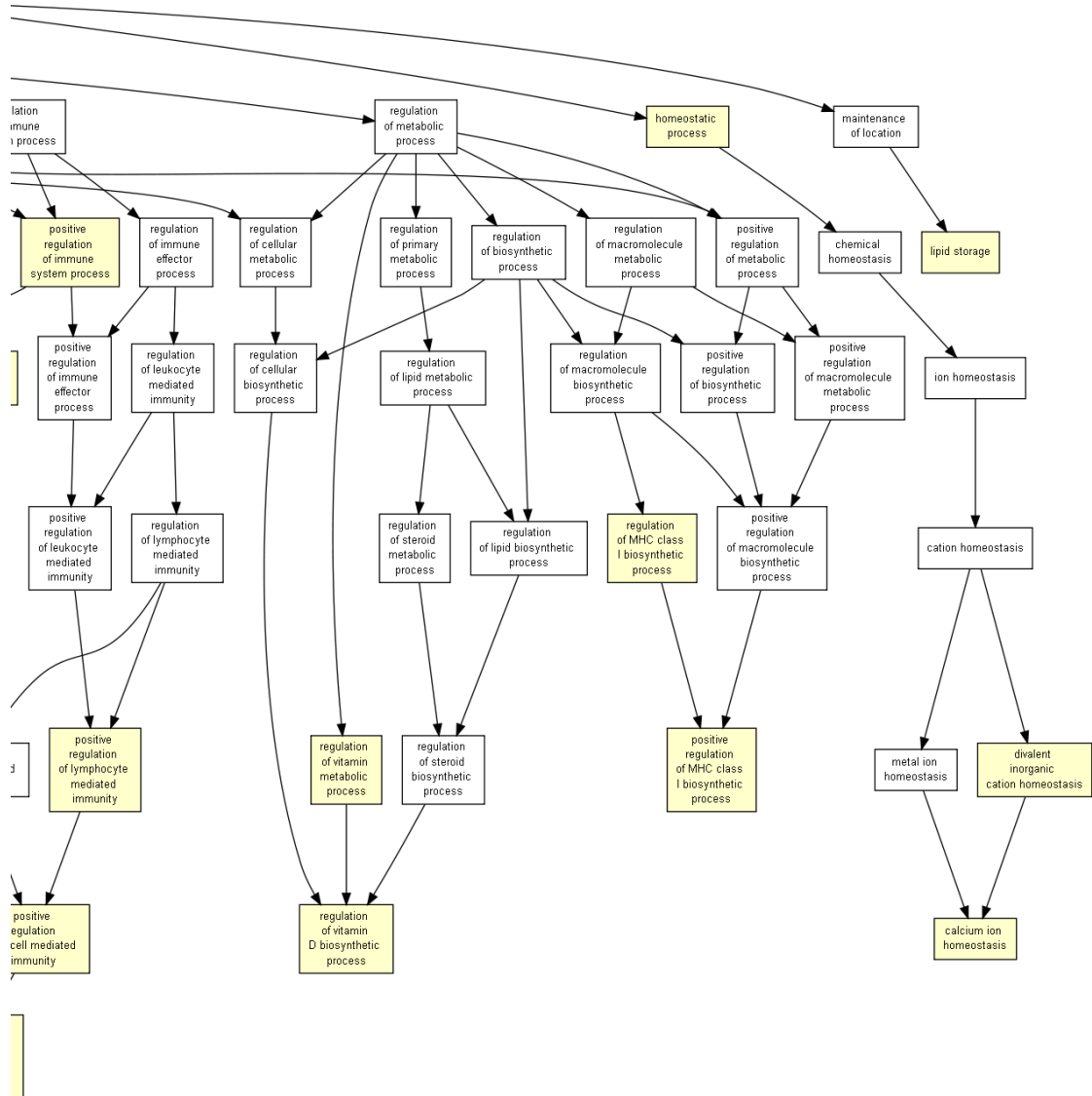
(f) 5/8



(g) 6/8



(h) 7/8



(i) 8/8

FIGURE 7.3 – (Neuf pages précédentes) Enrichissement des catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement exprimés dans l'épiderme caudal. a) Vue d'ensemble. b-i) Détail. L'enrichissement des termes comparé à l'ensemble des gènes transcrits est calculé à l'aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l'enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$ Jaune : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$ Orange : $10^{-9} \leq p < 10^{-7}$ Rouge : $p < 10^{-9}$

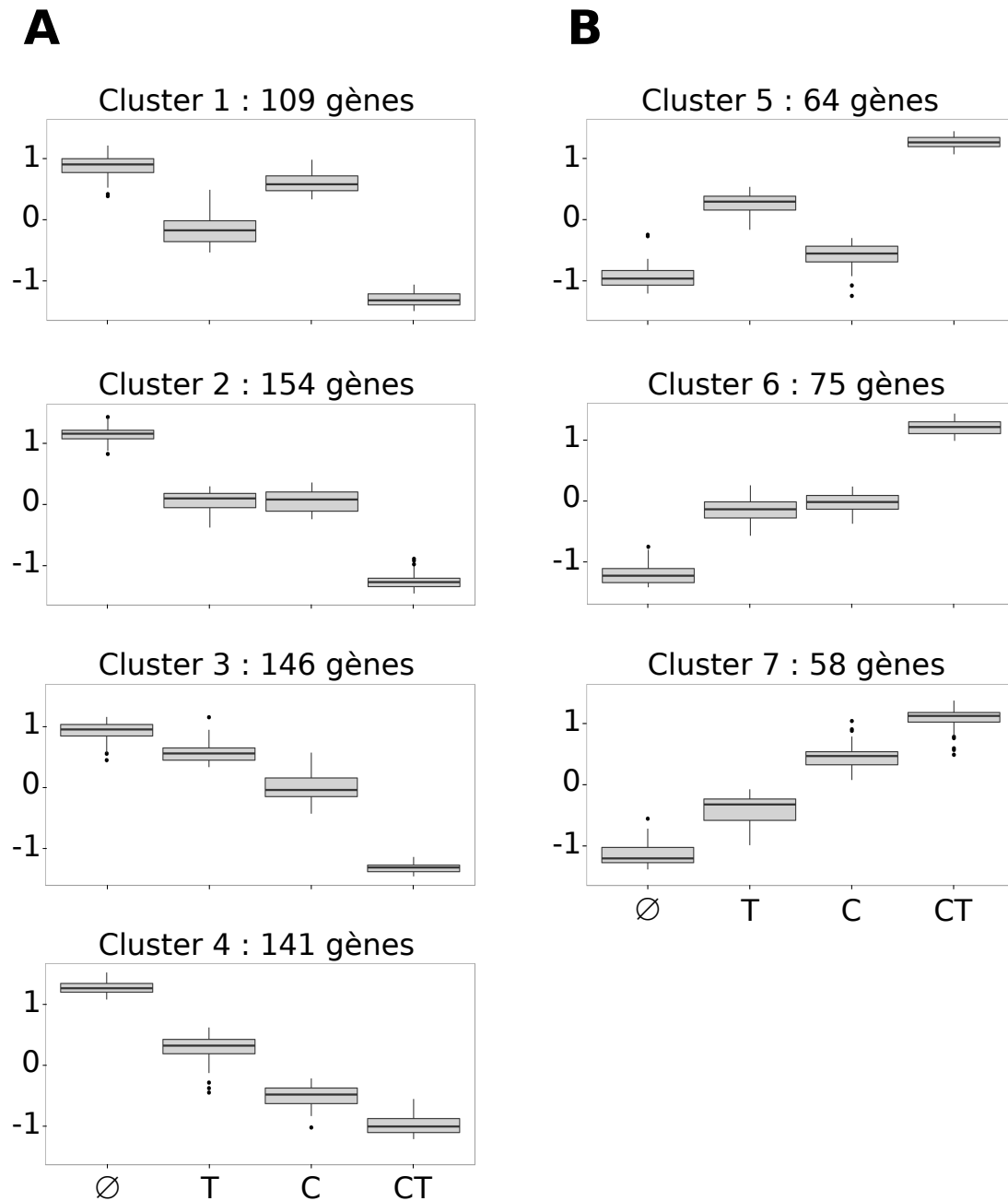


FIGURE 7.5 – Partitionnement des profils d’expression des gènes de type “potentiation”. La variance des niveaux d’expression à travers les quatre traitements est normalisée à 1 et la moyenne centrée sur 0. A) Gènes réprimés. B) Gènes induits. Ø : Contrôle; T : T₃; C : CORT; CT : CORT + T₃

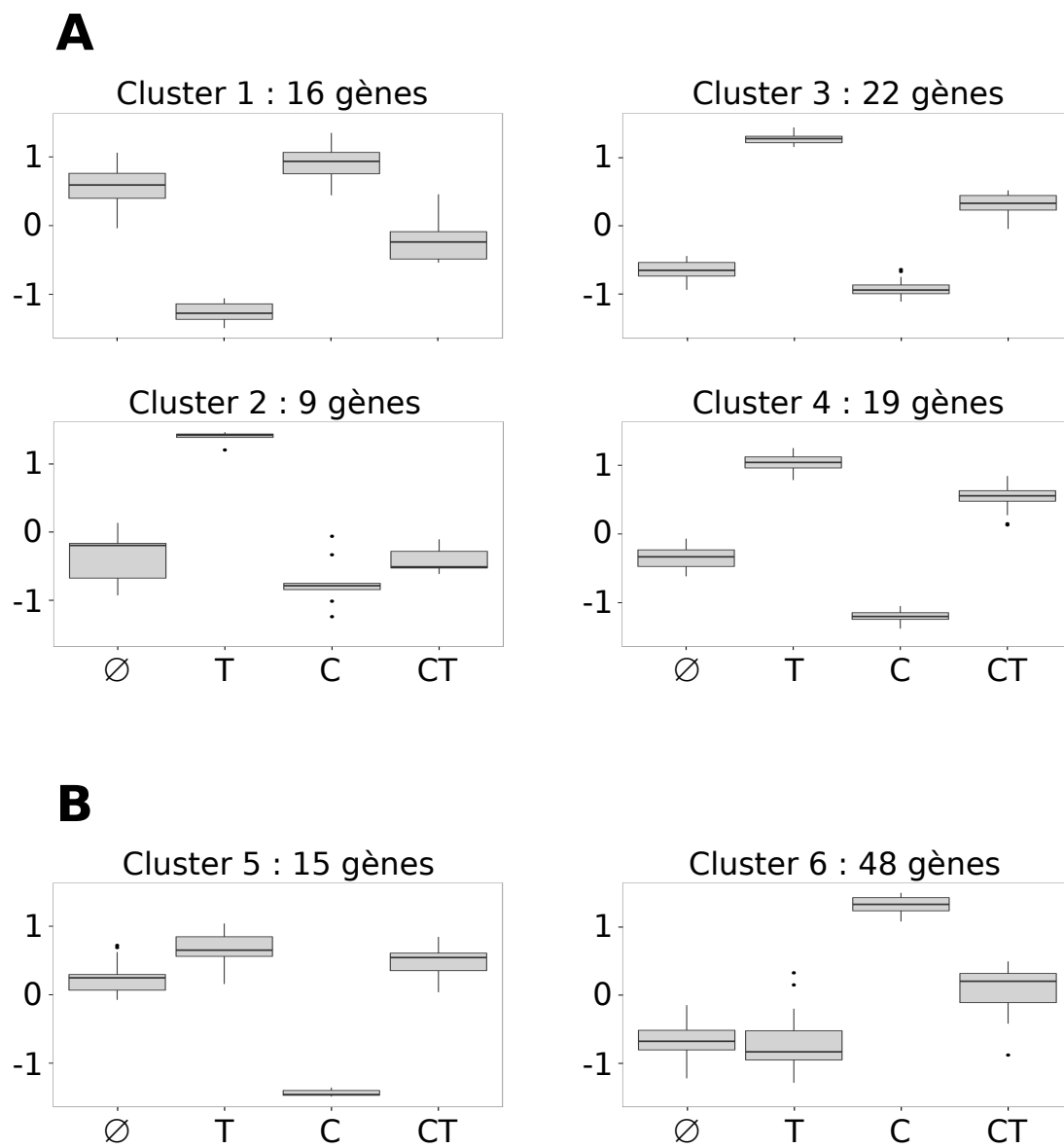


FIGURE 7.6 – Partitionnement des profils d’expression des gènes types “antagonisme”. La variance des niveaux d’expression à travers les quatre traitements est normalisée à 1 et la moyenne centrée sur 0. A) Inhibition de l’effet T₃ par la CORT. B) Inhibition de l’effet CORT par la T₃. $\emptyset$: Contrôle; T : T₃; C : CORT; CT : CORT + T₃



FIGURE 7.7 – Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes réprimés “potentiation”, correspondants aux clusters 1, 2, 3 et 4 de la Figure 7.5 A. Les catégories fonctionnelles enrichies ont été obtenues à l’aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l’enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$. Orange : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$.

Figure 7.8.

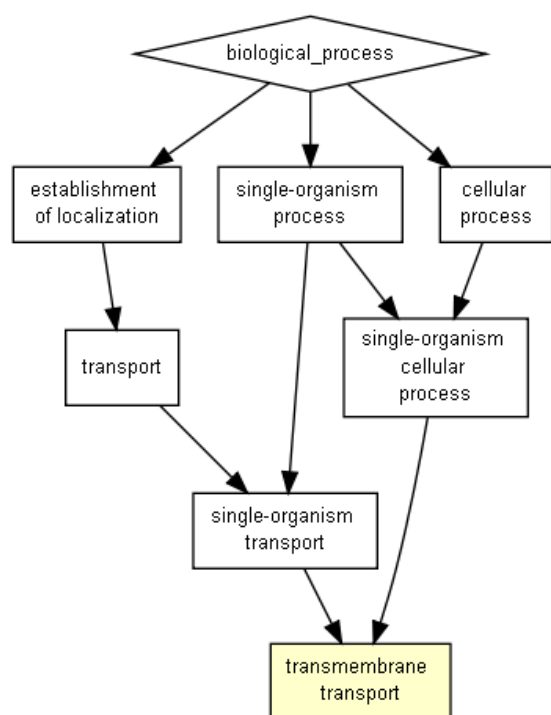


FIGURE 7.8 – Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes induits de type “potentiation”, correspondant aux clusters 5, 6 et 7 de la Figure 7.5 B. Les catégories fonctionnelles enrichies ont été obtenues à l’aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l’enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$

Les “clusters” regroupant les gènes dont les effets des HTs et des GCs s’antagonisent ne présentent pas d’enrichissement particulièrement fort pour une ou plusieurs fonctions biologiques définies. Il semble toutefois que le transport membranaire d’ions soit légèrement sur-représenté dans ces catégories (Figure 7.9 et Figure 7.10).

Les gènes ayant des profils de type “antagonisme” et dans une moindre mesure de type “potentiation” ont des effets biologiques très divers, soulignant le caractère pléiotrope des HTs et des GCs. Cette propriété, combinée à la taille restreinte des ensembles de gènes étudiés, contribue au faible enrichissement de catégories fonctionnelles par l’utilisation d’outils automatisés.

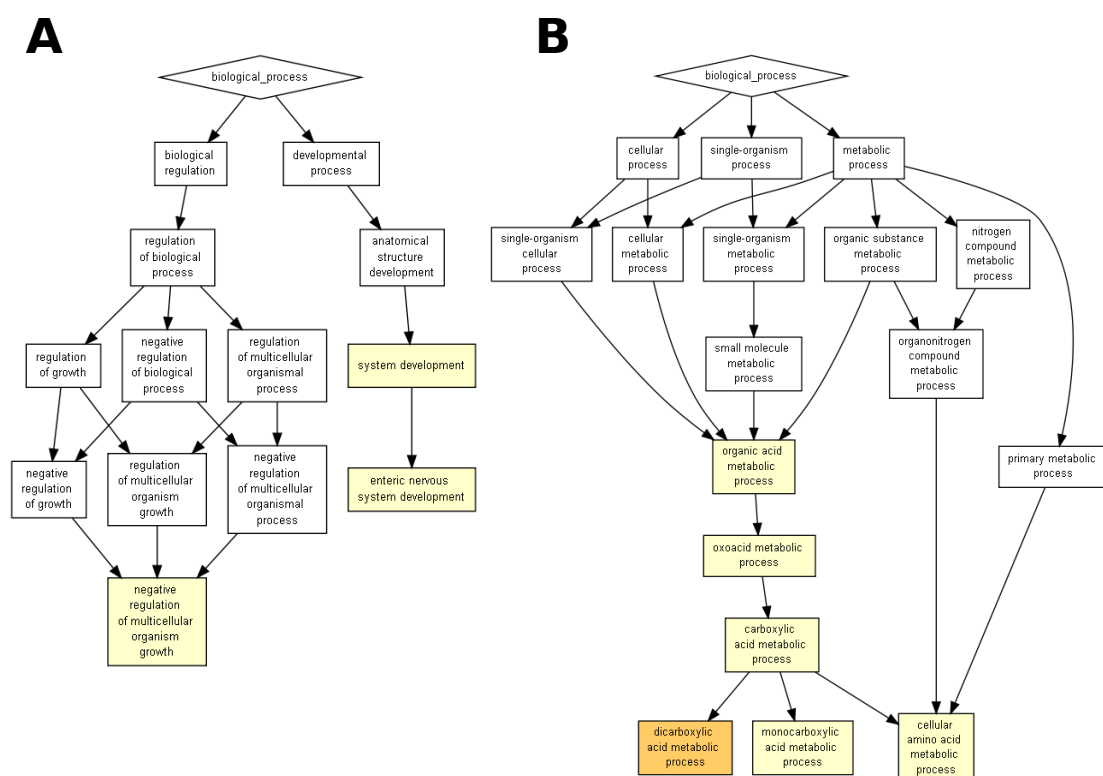


FIGURE 7.9 – Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes présentant une inhibition de l’effet CORT par la T₃, correspondant aux clusters 5 et 6 de la Figure 7.6 B. A) Gènes réprimés par la CORT (cluster 5, Figure 7.6 B). B) Gènes induits par la CORT (cluster 6, Figure 7.6 B). Les catégories fonctionnelles enrichies ont été obtenues à l’aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l’enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$ Orange : $10^{-7} \leq p < 10^{-5}$

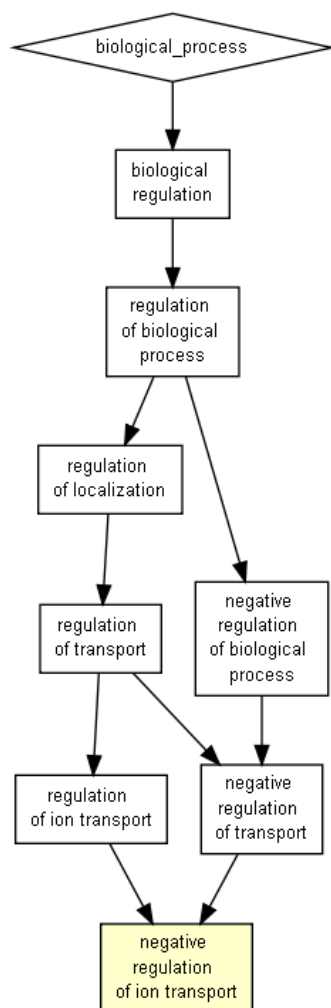


FIGURE 7.10 – Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes présentant une inhibition de l'effet T₃ par la CORT, correspondant au cluster 1 de la Figure 7.6 A. Les clusters 2, 3 et 4 de la Figure 7.6 A ne présentent pas de catégories fonctionnelles enrichies. Les catégories fonctionnelles enrichies ont été obtenues à l'aide de GOrilla (Eden *et al.*, 2009). Les couleurs des boîtes correspondent à la significativité de l'enrichissement. Jaune pâle : $10^{-5} \leq p < 10^{-3}$

7.3 Annotation fonctionnelle manuelle :

complément à la caractérisation automatisée de termes enrichis

Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets biologiques de l'interaction entre les deux voies de signalisation, j'ai réalisé l'annotation fonctionnelle manuelle des gènes dans les différentes catégories de profil d'expression (voir sous-section 5.4.2).

7.3.1 Annotation manuelle des gènes régulés de façon croisée par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

Les termes relevés et le nombre de gènes qui leur sont associés sont présentés Figure 7.11. Le contraste avec les méthodes d'annotation fonctionnelle automatisées est frappant : L'annotation manuelle fait ressortir un nombre important de gènes associés au cytosquelette, à l'adhésion cellulaire, à la matrice extra-cellulaire, aux processus d'inflammation et de régulation de la prolifération cellulaire / apoptose.

Enfin, il est intéressant de noter qu'il n'y a vraisemblablement pas de fonction biologique spécifiquement enrichie à chaque type interaction ("antagonisme" *vs* "potentiation").

7.3.2 Annotation manuelle des gènes constituant les profils "d'antagonisme"

J'ai ensuite représenté séparément les termes associés aux gènes dont l'effet de la T₃ est antagonisé par la CORT ("clusters" 1-4 Figure 7.6 A, Figure 7.12b) et dont l'effet de la CORT est antagonisé par la T₃ ("clusters" 5-6 Figure 7.6 B, Figure 7.12a).

De façon frappante, il semble que les termes enrichis soient très spécifiques des tissus, en particulier dans le cas de l'antagonisme de l'effet T₃ par la CORT.

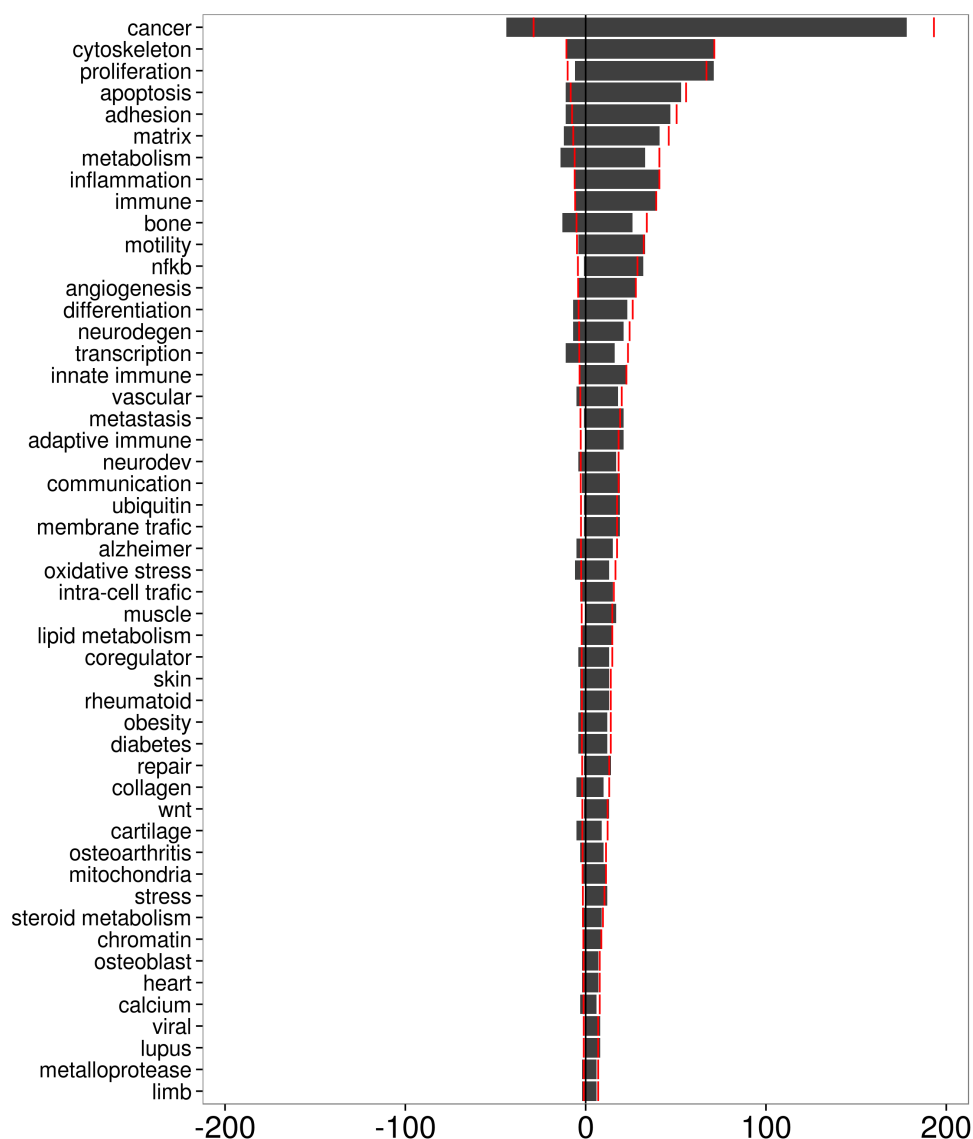


FIGURE 7.11 – Termes enrichis dans les catégories de gènes “antagonisés” (à gauches) et “potentiés” (à droite) dans l’épiderme caudal. La valeur absolue de l’axe des abscisses représente le nombre de gènes associé à chaque terme (axe des ordonnées). Seuls les 50 termes les plus représentés sont illustrés ici. Les barres verticales rouges correspondent au nombre théorique de gènes associés à chaque terme dans le cas d’une répartition aléatoire entre profils “antagonisés” et “potentiés”.

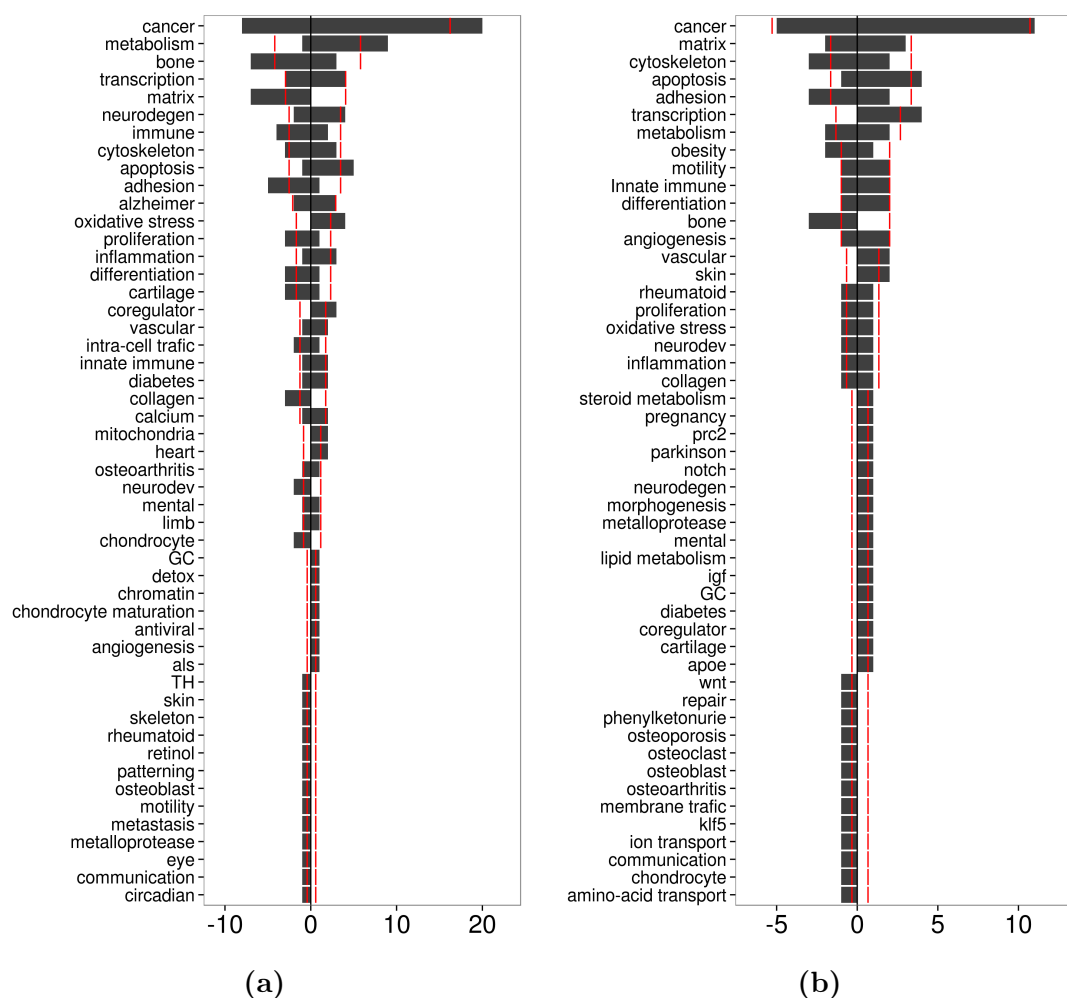


FIGURE 7.12 – Catégories fonctionnelles enrichies parmi les gènes présentant un profil de type “antagonisme” et réprimés (valeurs négatives, partie gauche de chaque sous-figure) ou induits (valeurs positives, partie droite de chaque sous-figure) dans l’épiderme caudal. 7.12a Effets de la CORT antagonisés par la T_3 , correspondant aux clusters 1-4 de la Figure 7.6 A. 7.12b Effets de la T_3 antagonisés par la CORT, correspondant aux clusters 5-6 de la Figure 7.6 B. La valeur absolue de l’axe des abscisses représente le nombre de gènes associé à chaque terme (axe des ordonnées). Seuls les 50 termes les plus représentés sont illustrés ici. Les barres verticales rouges correspondent au nombre théorique de gènes associés à chaque terme dans le cas d’une répartition aléatoire entre répression et induction.

Cette dichotomie se traduit par l'enrichissement de termes liés au métabolisme, au devenir cellulaire et au stress oxydatif pour les gènes induits par la T_3 ; de termes liés au remodelage de la matrice extra-cellulaire parmi les gènes réprimés. Le même type de dichotomie est observée pour les gènes dont l'effet de la CORT est antagonisé par la T_3 , mais dans une moindre mesure.

7.3.3 Annotation manuelle des gènes constituant les profils “potentiés”

Enfin, le même type d'analyse pour les gènes “potentiés” (Figure 7.13) ne révèle pas de fonction biologique préférentiellement associée au sens de la variation (si ce n'est le métabolisme qui tend à être légèrement enrichi parmi les gènes induits).

La majorité des gènes réprimés sont ici associés à des processus apoptotiques et de prolifération, au remodelage de la matrice extra-cellulaire, à l'adhésion et à la réponse du système immunitaire inné.

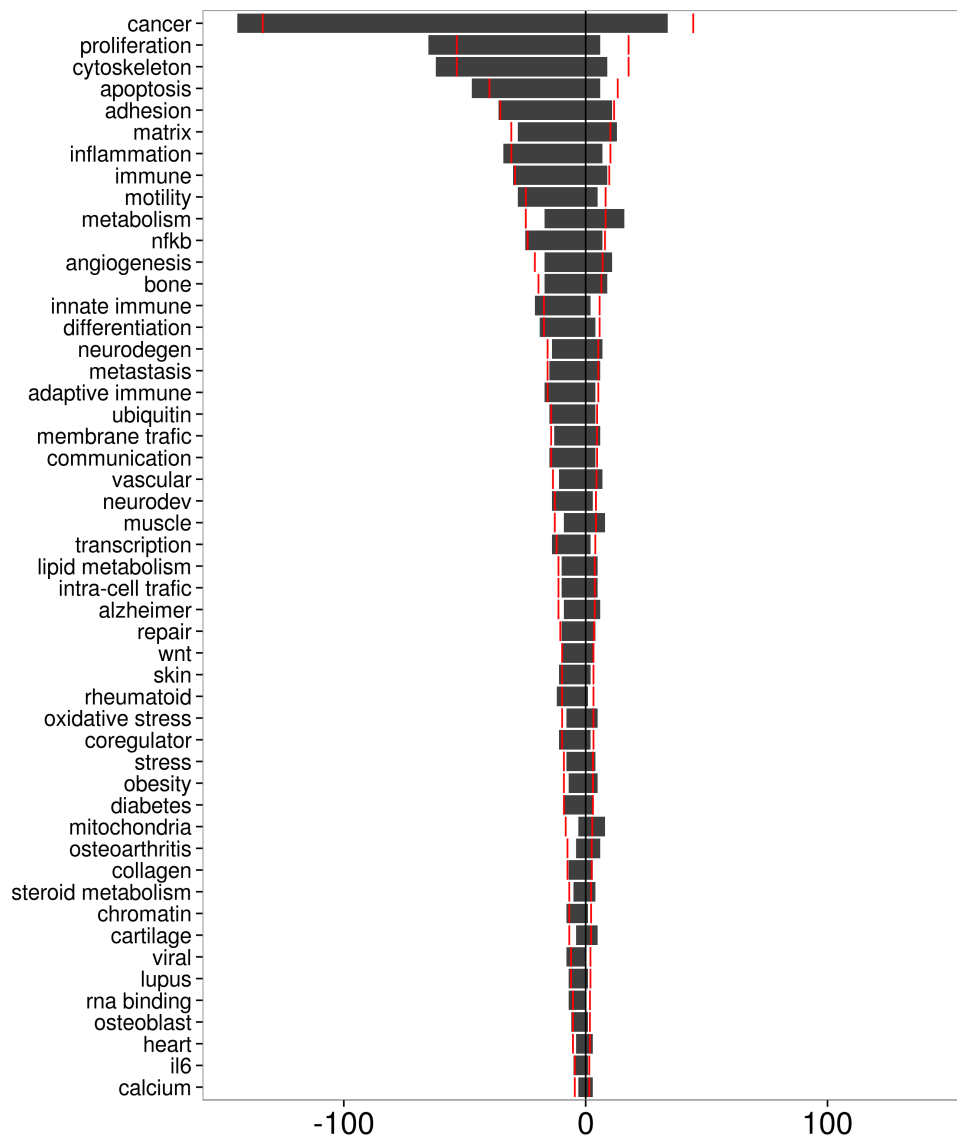


FIGURE 7.13 – Termes enrichis dans les catégories de type “potentiation” entre les effets des deux hormones dans l’épiderme caudal. Les valeurs négatives (partie gauche) correspondent à une potentiation de l’effet répresseur des hormones. Les valeurs positives (partie droite) correspondent à une potentiation de l’effet inducteur des hormones. La valeur absolue de l’axe des abscisses représente le nombre de gènes associé à chaque terme (axe des ordonnées). Seuls les 50 termes les plus représentés sont illustrés. Les barres verticales rouges correspondent au nombre théorique de gènes associés à chaque terme dans le cas d’une répartition aléatoire entre répression et induction.

Comparaison des profils d'expressions entre l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs

8.1 Comparaison globale des programmes transcriptionnels régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

Dans le cadre de la caractérisation des programmes transcriptionnel spécifiques des HLBs et du TF, j'ai partitionné les gènes différentiellement exprimés par rapport à la condition "contrôle" dans au moins une condition, quelque soit le tissu selon leur profils d'expression. Cela représente un total de 5392 gènes. Le résultat de cette classification sous forme de "heatmap" est présenté Figure 8.1. Sur cette figure, il apparaît que la réponse aux deux signaux hormonaux étudiés est en grande partie spécifique de chaque tissus. En effet, le nombre de gènes régulés dans le TF et les HLBs est très différent (1363 et 4741 respectivement). L'intersection de ces deux jeux de données révèle 795 gènes en commun.

En terme de proportions, 54,8 % des gènes ont un profil de type potentiation dans le TF alors qu'il ne représente que 4,3 % dans les HLBs. Pour les gènes "antagonistes"

alors que leur nombre est similaire dans les deux tissus étudiés (une centaine), il représente 2,4 % dans les HLBs et 9,5 % dans le TF. Il ressort que 75 gènes ont un profil de type “antagonisme” ou “potentiation” identique dans les deux tissus ce qui correspond à 9 % de ces gènes dans le TF (6 % du nombre de gènes différentiellement exprimés tous profils confondus) et 25 % dans les HLBs (1,7 % du nombre de gènes différentiellement exprimés tous profils confondus). Majoritairement ces gènes sont dans la catégorie des gènes “potentiés” (7 “antagonistes” pour 60 “potentiés”). Le comportement de certains gènes est particulier puisqu'ils sont “potentiés” dans un tissu et “antagonisés” dans l'autre (8 gènes) et inversement. Ceci est à mettre en perspective par rapport au nombre de gènes ne présentant qu'une réponse à la T_3 (358 dans le TF, 4394 dans les HLBs).

Les résultats présentés dans les deux chapitres précédents montrent que dans les pattes, la majeure partie de l'effet des hormones est tourné vers le métabolisme de lipides et des stéroïdes, le métabolisme des ARN et le système immunitaire. Dans ce tissu, les gènes présentant un profil d'expression dénotant une interaction entre les voies de signalisation HT et GC sont particulièrement enrichis en modulateurs de la réponse immunitaire innée. De même, dans le TF, la majorité de l'interaction entre les HTs et les GCs affecte la régulation de la prolifération cellulaire et de l'activation du système immunitaire. Il est intéressant de noter que dans les deux tissus, la majorité de l'enrichissement de termes associés au système immunitaire provient d'une même sous catégorie de profils d'expression, à savoir la potentiation de l'effet répresseur des HTs et des GCs.

Seuls deux gènes sont potentiés dans les HLBs et antagonisés dans le TF :

- EMILIN2 : Dans les HLBs $\log_2(FC) = 0,58 ; 0,19 ; 1,17$ dans les traitements T_3 , CORT et T_3 +CORT respectivement. Dans le TF $\log_2(FC) = -0,69 ; -0,02 ; -0,28$
- FGFBP1 : Dans les HLBs $\log_2(FC) = 0,79 ; 0,95 ; 1,68$. Dans le TF $\log_2(FC) = -0,93 ; 0,36 ; 0,07$

Ce sont deux facteurs extra-cellulaires, le premier étant un composant élastique de la matrice extra-cellulaire et le second se liant aux facteurs de croissance FGF pour potentialiser leur action. De même, 5 gènes sont “potentiés” dans le TF et “antagonisés” dans les HLBs :

- MOB2 : Dans les HLBs $\log_2(FC) = -0,65 ; 0,16 ; -0,26$. Dans le TF $\log_2(FC) = -0,27 ; -0,36 ; -0,80$
- NMI : Dans les HLBs $\log_2(FC) = 0,91 ; -0,96 ; -0,24$. Dans le TF $\log_2(FC) = -0,63 ; -1,75 ; -1,88$
- CCR2 : Dans les HLBs $\log_2(FC) = -1,61 ; -0,60 ; -1,00$. Dans le TF $\log_2(FC) = -1,02 ; -1,24 ; -1,67$
- ADAMTSL5 : Dans les HLBs $\log_2(FC) = -0,82 ; 0,03 ; -0,26$. Dans le TF $\log_2(FC) = 0,97 ; 0,77 ; 1,48$
- CAPN2 : Dans les HLBs $\log_2(FC) = -1,28 ; -0,04 ; -0,73$. Dans le TF $\log_2(FC) = -0,14 ; -0,03 ; -0,60$

Ils couvrent des fonctions biologiques allant du contrôle du cycle cellulaire (MOB2) au système immunitaire (NMI, CCR2) en passant par le remodelage de la matrice extra-cellulaire (ADAMTSL5).

8.2 Vieillesse

Comme spécifié précédemment, une perturbation du signal thyroïdien durant la période périnatale ou la métamorphose peut avoir des conséquences délétères sur le long terme. J’ai donc sélectionné un ensemble de gènes impliqués dans un vieillissement prématuré des structures et fonctions biologiques à partir de la base de données HAGR (de Magalhães *et al.*, 2005). Les profils d’expression de 222 orthologues (sur 289) sont présentés Figure 8.2a. Parmi les 222 gènes, 10 ont une expression spécifique du TFs ou des HLBs. Après avoir filtré cet ensemble de gènes pour ne conserver que ceux qui sont différentiellement exprimés dans au moins une condition (97 gènes), il apparaît une dichotomie entre les deux tissus : alors que dans les HLB 87 gènes sont affectés par au moins un des traitements hormonaux, seuls 25 le sont dans le TF (Figure 8.2b). Dans le TF, 10 gènes sont spécifiques de ce tissu alors que 72 sont spécifiques des HLBs. De plus, tous tissus confondus, 72, 6 et 86 gènes sont régulés par la T_3 , la CORT et le co-traitement avec les deux hormones.

Parmi les gènes dont l’expression présente un profil de type “antagonisme” ou “potentiation” par les HTs et les GCs, nous trouvons entre autres dans le TF :

- STAT-5B ($\log_2(FC) = -0,11 ; 1,23 ; 0,66$ dans les traitements T₃, CORT et T₃+CORT respectivement)
- FOXO3 ($\log_2(FC) = 0,43 ; 0,61 ; 1,04$)
- IGF1R ($\log_2(FC) = 1,28 ; -0,03 ; 0,78$)
- GHR ($\log_2(FC) = -1,40 ; 0,20 ; 0,05$)
- RAD51 ($\log_2(FC) = -0,98 ; -1,12 ; -1,46$)

et dans les HLBs :

- CEBP α (protéine α de liaison à l’enhanceur/CCAAT, “CCAAT/enhancer-binding protein α ”) ($\log_2(FC) = -0,25 ; 0,57 ; 1,24$)
- LEPR (récepteur à la leptine) ($\log_2(FC) = -1,40 ; 1,23 ; 0,70$)

SOCS2 (suppresseur de la signalisation des cytokines, 2, “suppressor of cytokine signaling 2”) est induit par la T₃ dans les HLBs ($\log_2(FC) = 1,16, -0,20, 1,01$ dans les traitements T₃, CORT et T₃+CORT respectivement) et réprimé de façon “potentiée” par les deux hormones dans le TF ($\log_2(FC) = -0,17, -0,72, -1,30$). Dans les deux tissus, l’induction de PCK1 CORT-dépendante ($\log_2(FC) = 3,74$ et $5,00$ dans les HLBs et le TF respectivement) est antagonisée par la T₃ ($\log_2(FC) = 2,67$ et $3,10$ respectivement).

8.3 Les modificateurs post-traductionnels des histones

Outre une action sur la mise en place des structures anatomiques et morphologiques, une perturbation de la signalisation thyroïdienne pourrait affecter la présence de modificateurs de la chromatine et influencer sur la spécificité spatiale et temporelle de déposition des marques. J’ai donc sélectionné sur la base de leur annotation GO, les gènes impliqués dans la (dés)acétylation et la (dé)méthylation des histones. La liste initiale comprend 241 gènes humains pour lesquels un orthologue chez le Xénope a pu être identifié. Dans le TF et les HLBs, 203 et 205 gènes respectivement sont exprimés (passent l’étape de “filtre indépendant”, voir sous-section 5.3.5), pour un total de 209 gènes. La Figure 8.3a présente les profils d’expression de l’ensemble de ces gènes. Exceptés quelques sous ensembles de gènes et indépendamment de leur significativité en terme d’expression différentielle, les

profils d'expression entre le TF et les HLB restent similaires. La Figure 8.3b présente uniquement les gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition. Cela représente 17 gènes dans le TF et 73 gènes dans les HLB, pour un total de 80 gènes. Il ressort que la majorité des gènes ne sont différentiellement exprimés que dans les HLB. De façon intéressante, là encore le chevauchement entre les deux sous ensembles de gènes est restreint et souligne ici une spécificité tissulaire de la réponse. Nous remarquons par exemple que JHDM1D (homologue D de l'histone déméthylase 1 contenant un domaine jumonji C, “jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D”) est, sous l'effet de la T_3 , réprimé dans les HLBs ($\log_2(FC) = -1,14; -0,17; -0,70$) mais induit dans le TF sous l'effet de la T_3 et de la CORT ($\log_2(FC) = 0,89; 1,35; 1,40$). NSD1 n'est induit par la T_3 que dans les HLBs ($\log_2(FC) = 1,30; 0,17; 1,37$), de même que TRRAP ($\log_2(FC) = 1,14; 0,1; 1,19$).

Les gènes catégorisés comme cibles d'une interaction entre HTs et GCs et impliqués dans la modification des histones incluent 6 gènes :

- CDK2 (répression “potentiée” : $\log_2(FC) = -0,48; -0,66; -1,15$)
- GFI1B (induction CORT-dépendante antagonisée par la T_3 : $\log_2(FC) = 0,09; 1,97; 0,63$)
- PRKCB (répression “potentiée” : $\log_2(FC) = -0,16; -0,42; -1,20$)
- PHF15 (répression “potentiée” : $\log_2(FC) = -0,76; -0,57; -1,28$)
- MECP2 (répression “potentiée” : $\log_2(FC) = -0,92; -0,44; -1,22$)
- SATB1 (répression “potentiée” : $\log_2(FC) = -0,22; -0,69; -1,30$)

Dans les HLB, aucun gène impliqué dans un effet croisé de la T_3 et de la CORT ne semble impliqué dans la modification des histones. Enfin, il est important de mentionner que certains gènes dans cette catégorie (et la suivante) paraissent au premier abord mal catégorisés. La raison est que les listes de gènes ont été obtenues programmatically en utilisant la GO. Ainsi, MECP2, connu pour être essentiel dans la lecture de l'ADN méthylé, n'est pas à strictement parler impliqué dans les processus de méthylation de l'ADN. Il a été en revanche associé à la favorisation du dépôt de certaines modifications d'histones en fonction de l'état de méthylation d'un locus (Fuks *et al.*, 2003).

8.4 La méthylation de l'ADN

La modification de l'épigénome peut aussi se traduire par la méthylation de l'ADN au niveau d'îlots CpG, en général associés à la répression de la transcription. De même que ce qui a été effectué dans la section précédente, j'ai sélectionné 43 gènes impliqués dans les processus de méthylation de l'ADN, dont 33 sont exprimés dans les tissus étudiés, avec 1 gène spécifiquement exprimé dans les HLBs. Leurs profils d'expression sont présentés Figure 8.4a. Nous notons la présence du gène TDRD9 (protéine 9 contenant un domaine TUDOR, “tudor domain containing 9”) pour lequel l'expression est très forte dans la condition CORT dans les HLBs. Celui-ci n'est pas inclus dans la Figure 8.4b car cette forte expression n'est validée que dans un seul des trois répliquats biologiques. La variance importante associée à son expression dans ce tissu l'empêche donc de passer les seuils statistiques. Au total, 17 gènes sont différentiellement exprimés, dont 16 dans les HLBs. Seuls deux gènes sont en commun parmi les gènes différentiellement exprimés dans les deux tissus et leurs profils d'expression sont similaires. Il est intéressant de noter que sous l'action de la T_3 et de la CORT, APOBEC2 (apolipoprotéine B enzyme d'édition des ARNm, similaire au polypeptide catalytique 2, “apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2”) est réprimé dans les HLBs mais induit dans le TF. GSK3B (impliqué dans l'expression de DNMT3A (ADN méthyltransférase 3A, “DNA methyltransferase 3A”)) est quant à lui induit par la T_3 spécifiquement dans les HLBs, de même que MGMT.

Aucun gène régulé de façon croisée par la T_3 et la CORT n'est retrouvé dans cette liste. En revanche, certains gènes montrent une tendance à une telle interaction entre les voies de signalisation. En particulier, UHRF1 (protéine 1 semblable à l'ubiquitine avec des domaines PHD et en doigt “RING”, “ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1”), impliqué dans la maintenance de la méthylation de l'ADN, semble réprimé de façon “potentiée” dans les deux tissus : $\log_2(FC) = -0,16 ; -0,03 ; -0,59$ dans les HLBs et $\log_2(FC) = -0,73 ; -0,76 ; -1,42$ dans le TF. Enfin, il est important de préciser que MECP2 (protéine 2 de liaison aux CpG méthylés, “methyl CpG binding protein 2”) n'est pas inclus dans cette liste car il n'est pas impliqué dans la méthylation de l'ADN à proprement

parler (voir section 8.3)

8.5 Métabolisme et signalisation des hormones thyroïdiennes

Enfin, je me suis intéressé à 17 gènes connus pour être importants dans la signalisation, le métabolisme ou le transport des HTs afin de caractériser d'éventuelles interactions croisées à ce niveau. Les profils d'expression de 12 d'entre eux sont présentés Figure 8.5a.

La majorité d'entre eux (9) sont différentiellement exprimés dans au moins un traitement (Figure 8.5b), dont 4 spécifiquement dans les HLBs. Il est intéressant de noter que l'expression d'un seul gène est fortement réprimée par les GCs, et uniquement dans le TF. Il s'agit de DIO3, qui fait partie des gènes co-régulés par les deux hormones. Les autres gènes dont l'expression est potentiée ou antagonisée par les HTs et les GCs incluent DIO2 et MCT8 dans le TF ; $TR\beta$, $RXR\beta$ et $RXR\gamma$, DIO2 et DIO3 dans les HLBs. À noter que dans la Figure 8.5, DIO3 dans les HLBs n'apparaît pas comme "antagonisé" car les facteurs d'induction ont été écrêtés à ± 4 afin de ne pas affecter le contraste pour les autres gènes.

L'expression de DIO2 est induite par la T_3 et la CORT dans le TF ($\log_2(FC) = 2, 31$ respectivement) et dans une moindre mesure dans les HLBs. En présence des deux hormones, son expression est potentiée dans les deux tissus.

En ce qui concerne DIO3, elle est fortement induite par la T_3 dans le TF ($\log_2(FC) = 3, 65$) et dans les HLBs ($\log_2(FC) = 5, 76$). Alors que la CORT a peu d'effet sur sa transcription dans les HLBs, elle réprime fortement sa transcription dans le TF ($\log_2(FC) = -2, 39$). Enfin, dans les deux tissus, le co-traitement induit une induction de la transcription moins forte que par la T_3 seule ($\log_2(FC) = 1, 79$ dans le TF ; $\log_2(FC) = 4, 52$ dans les HLBs).

Les HTs induisent fortement la transcription de LAT (transporteur d'acides aminés de type L, "L-type amino-acid transporter")¹ dans les HLBs ($\log_2(FC) = 3, 1$) mais pas dans le TF. Alors que MCT10 est légèrement induit par la T_3 dans les deux tissus, l'expression de MCT8 n'est pas affectée par la T_3 . Le traitement à la CORT induit marginalement la transcription de LAT1 et OATP1c1 dans les

HLB et de MCT8 dans le TF, mais augmente de près d'un facteur 2,5 l'expression de LAT1 dans le TF. Enfin, le co-traitement induit la sur-expression de MCT8 et 10 dans les HLBs et le TF. L'expression de LAT1 lors du co-traitement suit les niveaux d'induction provoqués par la T_3 seule dans les HLBs et par la CORT seule dans le TF.

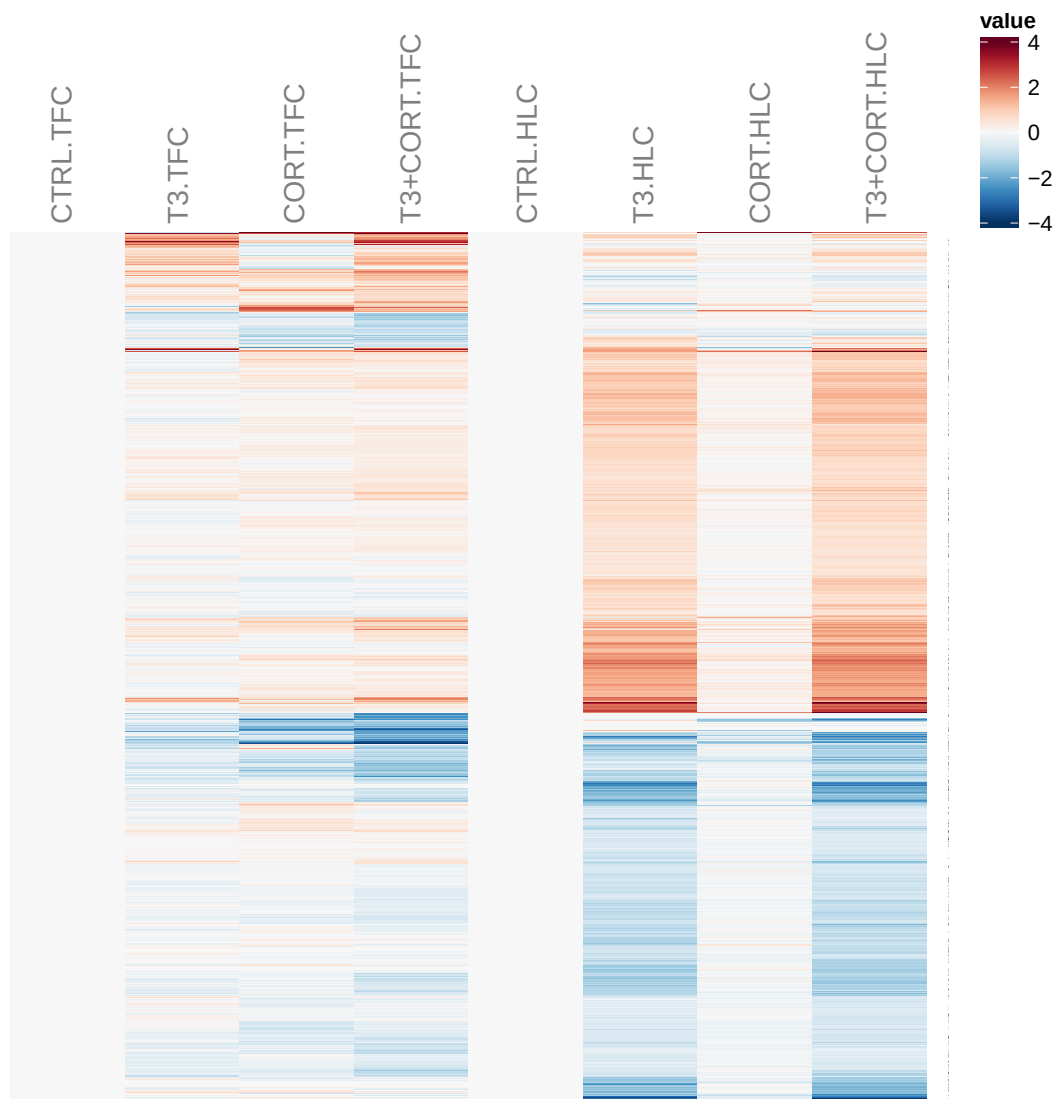


FIGURE 8.1 – Heatmap des profils d’expression des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition (pattes et queue confondues, 5392 gènes). Chaque ligne correspond à un gène. Chaque colonne correspond à un traitement dans les deux tissus considérés (TF : “.TFC” HLB : “.HLC”). L’intensité des couleurs rouges et bleues est proportionnelle au facteur d’induction de l’expression en $\log_2$ d’un gène donné dans un tissu donné et dans un traitement donné par rapport à la condition “contrôle” (CTRL.TFC et CTRL.HLC). Les facteurs d’induction ont été plafonnés à 4 afin que le contraste ne soit pas capturé par les gènes les plus fortement exprimés. La similitude des profils d’expression des gènes est exprimée en fonction de leur distance euclidienne. Cette mesure permet leur regroupement au sein de la figure. Le niveau d’expression des gènes qui ne sont pas exprimés dans un tissu est fixé à zéro et apparaissent en gris à travers les quatre traitements.

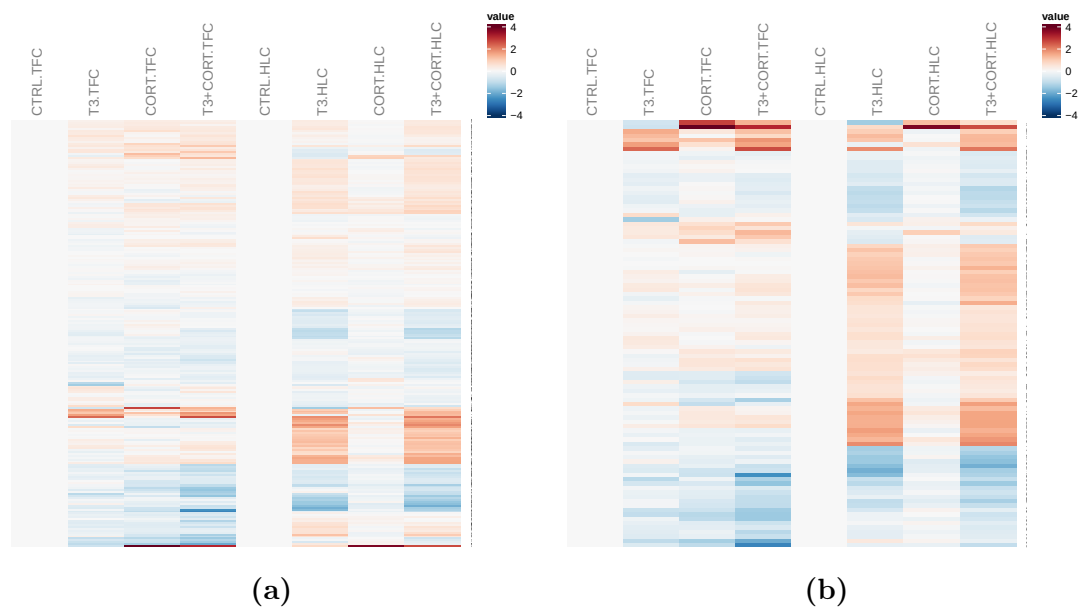


FIGURE 8.2 – Comparaison des profils d’expression, dans l’épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans le vieillissement. 8.2a Tous les gènes. 8.2b Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition (présentés Figure 8.1).

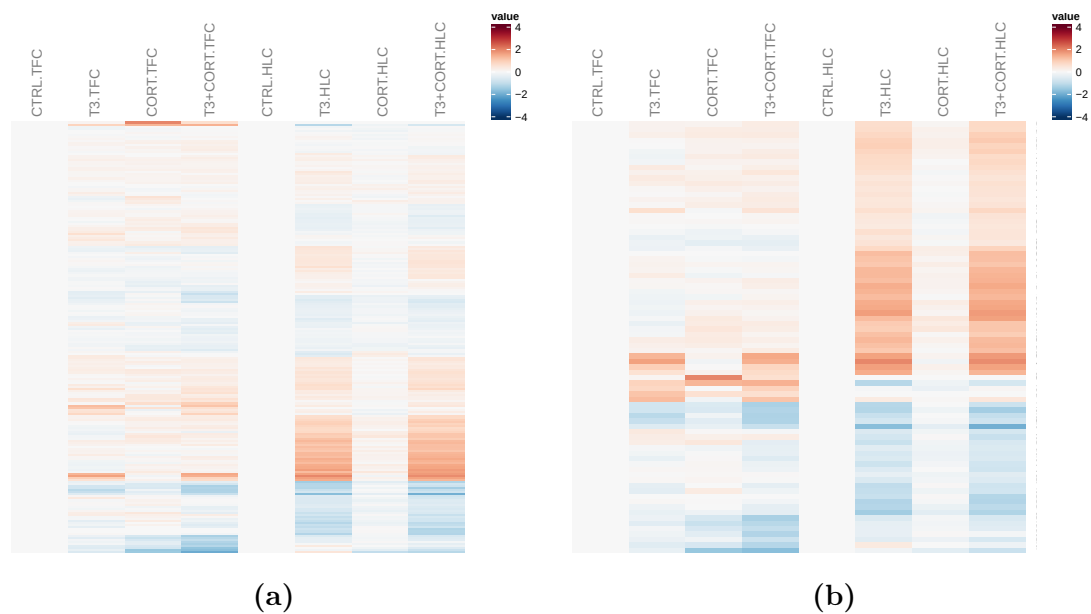


FIGURE 8.3 – Comparaison des profils d’expression, dans l’épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles d’histones. 8.3a : Tous les gènes. 8.3b : Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition (voir Figure 8.1).

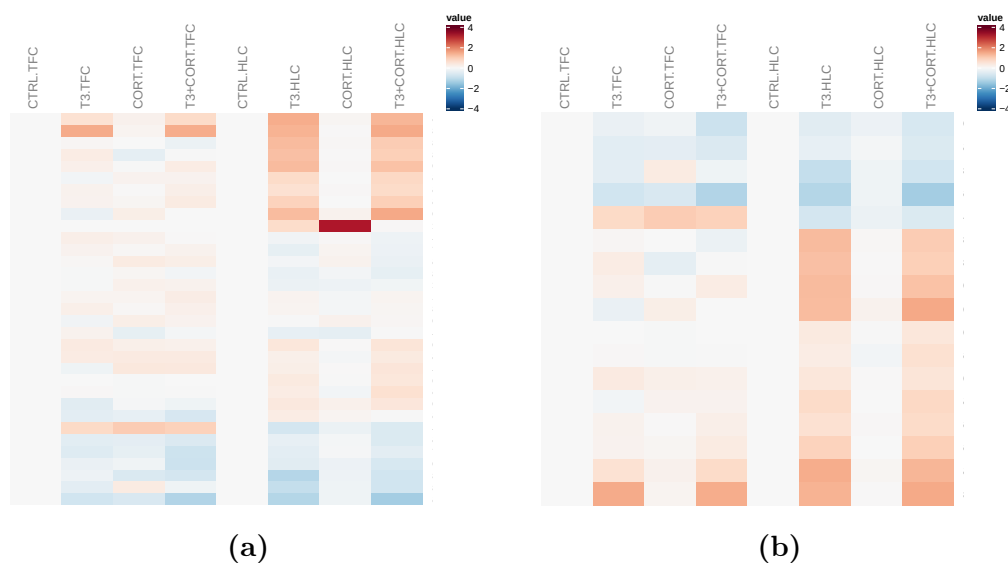


FIGURE 8.4 – Comparaison des profils d'expression, dans l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN 8.4a Tous les gènes. 8.4b Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

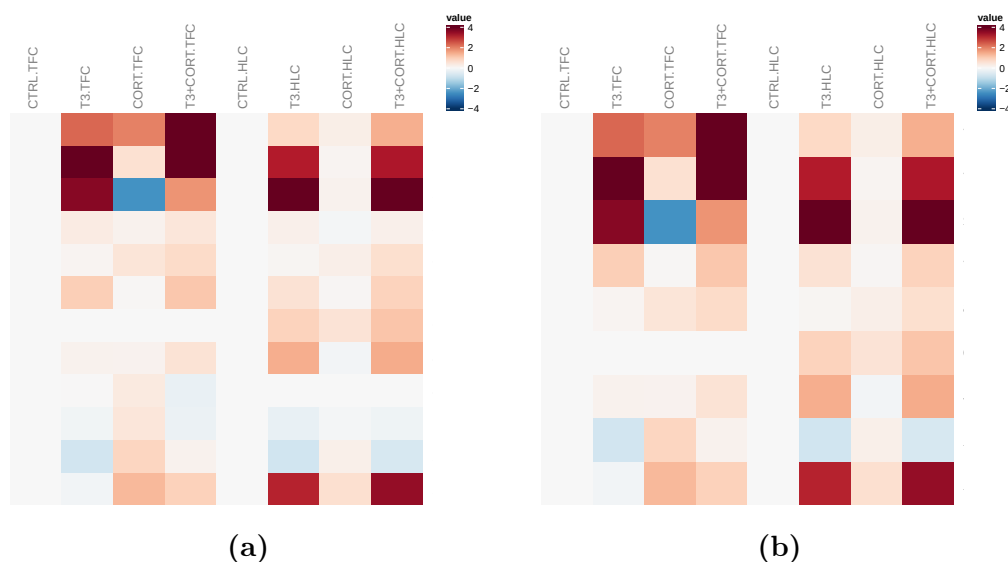


FIGURE 8.5 – Comparaison des profils d'expression, dans l'épiderme caudal et les bourgeons de membres postérieurs, des gènes impliqués dans la signalisation et le métabolisme des hormones thyroïdiennes. 8.5a Tous les gènes 8.5b Sélection des gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

Quatrième partie

Discussion

Profils d'expression des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

9.1 Une diversité de profils d'expression

9.1.1 Tous les profils d'expression ne sont pas dans la nature

La réponse de l'expression d'un gène en fonction d'un stimulus est un processus finement régulé. Compte tenu de la multiplicité des actions des HTs et des GCs, nous aurions pu nous attendre à une combinatoire diversifiée et étendue. En ne considérant la modulation de l'expression d'un gène que comme un phénomène trinaire (pas d'effet, répression, induction), le traitement combiné avec les deux hormones pourrait donner lieu à 27 types de profils différents, et jusqu'à 125 si nous prenons en compte qualitativement les interactions possibles entre les deux hormones. Pourtant, au vu des données, la diversité d'action des HTs et des GCs est restreinte. En effet, en combinant les types de réponse dans les deux tissus, nous n'en comptons qu'à peine plus d'une quinzaine. Par exemple, des profils correspondants à une répression de la transcription par chaque hormone et à une

induction de la transcription lors d'un traitement combiné ne sont pas observés (le cas inverse non plus).

Il est intéressant de noter que les deux tissus partagent essentiellement les mêmes types de profils (bien qu'en des proportions différentes). La seule exception concerne un type de profil propre au TF et correspondant à un antagonisme de la réponse à la CORT par la T_3 . Il est cependant important de relativiser ces observations car la spécificité tissulaire que nous observons n'est pas liée à des profils spécifiques des tissus mais plutôt au nombre et à la composition en gènes régulés dans chacun des profils commun entre les deux tissus. Au niveau des proportions, nous avons mis en évidence que les gènes de type "potentiation" représentent plus de la moitié des gènes différentiellement exprimés dans le TF, ce qui contraste fortement avec les effectifs trouvés dans les HLBs. Les gènes présentant un profil d'expression "d'antagonisme" concernent environs le même nombre de gènes dans les deux tissus, mais correspondent à des proportions radicalement différente compte tenu des effectifs différents de gènes différentiellement exprimés dans au moins une condition.

9.1.2 Un programme commun entre les deux tissus

Cette section vise à discuter des gènes dont l'expression est affectée de façon similaire dans les deux tissus, et qui pourrait représenter le noyau dur de réseaux de régulation communs. Ces gènes pourraient ainsi faire partie d'une sorte de "caisse à outil" ubiquitaire répondant de façon stéréotypée aux régulations croisées par les deux hormones.

Toutefois, peu de gènes (75 gènes) sont régulés sous l'effet des régulations croisées par les HTs et les GCs dans les deux tissus, quelque soit la nature des interactions. Ces gènes correspondent essentiellement au système immunitaire, à la biologie de la matrice extra-cellulaire, et au développement.

9.1.2.1 Des régulations croisées communes aux deux tissus

Parmi les gènes "potentiés" dans les deux tissus, 60 sont en commun et participent à des processus immunitaires et inflammatoires. L'intersection des ensembles de gènes "antagonisés" dans un tissu mais pas dans le second se limitent à 7 gènes

impliqués dans le métabolisme général, la biologie de la matrice extracellulaire (par exemple MMP13L) et le métabolisme des HTs (DIO3).

Il n'existe ainsi quasiment pas d'interactions croisées qui s'opposent dans les deux tissus ("potentiation" *vs* "antagonisme"). Malgré la forte hétérogénéité dans les différentes catégories (60 *vs* 7 gènes), ces gènes répondent à un même processus biologique, un remodelage accéléré des tissus. Les régulations croisées potentialisent fortement l'expression de ces gènes, ce qui reflète un rôle "d'accélérateur" de la métamorphose. A l'inverse, les régulations croisées ne semblent interférer qu'avec une minorité de ces gènes (seulement 7). Bien que cela ne présage pas des effets correspondants à plus long terme, cela suggère tout de même que les interactions croisées perturbent moins les processus développementaux qu'elles ne les potentialisent. Cela illustre peut être la robustesse des réseaux de régulation, qui sont connus pour jouer un rôle de tampon et/ou d'intégration de différents signaux.

9.1.2.2 Des régulations croisées spécifiques de chaque tissu

Alors que le changement (ou la conservation) du type d'interaction croisées entre les HLBs et le TF concerne une minorité de gènes, la majeure différence de régulation croisée entre les deux tissus concerne les gènes co-régulés dans un seul des deux tissus. Nous trouvons ainsi que 726 gènes sont soumis à des régulations croisées dans le TF mais pas dans les HLBs. Ils correspondent essentiellement à des programmes développementaux. Ceci contraste avec les 243 gènes co-régulés dans les HLBs mais pas dans le TF. Ainsi, la régulation croisée de gènes par les deux hormones est majoritairement spécifique des tissus. Les effets transcriptionnels vont donc potentiellement sous-tendre des effets différents dans les deux tissus.

En conclusion, les interactions croisées affectent beaucoup plus les programmes transcriptionnel spécifiques de chaque tissu que les programmes transcriptionnels communs. Il est donc difficile d'avoir un pouvoir prédictif sur l'impact des régulations croisées à l'échelle de l'organisme, étant donné la forte tissu-spécificité de la réponse aux interactions croisées. Cette quasi absence de réponse "stéréotypée" aux régulations croisées par les HTs et les GCs à travers l'ensemble des tissus renforce l'importance de ne pas extrapoler les données d'un tissu à un autre.

Cette diversité de profils suggère l'existence d'un nombre limité de mécanismes moléculaires sous-tendant les interactions entre HTs et GCs. Il est aussi intéressant de voir que certains gènes changent de catégorie en fonction du tissu. Ceux-ci présentent une certaine complexité dans les mécanismes moléculaires impliqués dans ce type de comportement. Nous discuterons de deux niveaux où les deux signaux hormonaux peuvent interagir et ainsi affecter les niveaux d'expression de leurs gènes cibles.

- la compétence des tissus à répondre aux ligands
- le mécanisme d'action de leur récepteur respectif

9.1.3 Profils d'expression et compétence pour répondre aux hormones thyroïdiennes et aux glucocorticoïdes

9.1.3.1 Transporteurs cellulaires

La première étape pour qu'un signal hormonal agisse sur une cellule est l'entrée de ce signal dans la cellule. Pour les GCs, l'entrée suit un mécanisme passif qui ne représente donc pas un processus pouvant agir sur la concentration en GCs dans la cellule. Nous nous concentrerons dans cette sous-section sur les HT qui elles ont besoin d'un transporteur. Comme vu dans l'introduction, il existe plusieurs transporteurs des HT. Dans la condition sans hormone, OATP1c1 n'est exprimé que dans les HLBs. Il n'y a pas de transporteur uniquement exprimé dans le TF. les HTs induisent fortement la transcription de LAT1 spécifiquement dans les HLBs. Au contraire, l'induction de son expression par la CORT est restreinte au TF. Il ne semble pas y avoir d'interaction croisée pour ce gène. Concernant MCT8 et MCT10, ils présentent tous deux un profil d'expression correspondant à une potentiation des effets d'une hormone par la seconde (additivité ou synergie).

Les transporteurs des hormones thyroïdiennes sont souvent impliquées aussi bien dans l'entrée et l'efflux des HTs. La potentiation de l'expression HT-dépendante (parfois tissu-spécifique) de transporteurs par la CORT suggère ainsi que les GCs vont favoriser le taux de renouvellement des HTs au sein de la cellule.

9.1.3.2 Métabolisme intracellulaire

Le second niveau de régulation de la disponibilité en ligand se fait au niveau de la métabolisation de précurseurs en facteurs actifs ou la conversion en des métabolites inactifs. Dans le cas des HTs, cette fonction est assurée par les désiodases. En ce qui concerne les GCs, les enzymes participant à la voie de biosynthèse des stéroïdes et les 11- β -HSD1 et 2 vont pouvoir assurer leur inter-conversion en d'autres métabolites stéroïdiens (voir sous-section 2.2.3).

Métabolisme intracellulaire des hormones thyroïdiennes La désiodase principalement activante, qui converti la T_4 en T_3 , est la DIO2. La transcription de celle-ci est induite par les HTs et les GCs dans les deux tissus. Un co-traitement résulte en une expression plus forte qu'avec chaque hormone seule.

L'inactivation des HTs est principalement assurée par la DIO3. Dans les deux tissus, elle présente un profil d'expression de type "antagonisme", où les GCs semblent inhiber en partie l'action des HTs sur son expression.

Ceci suggère que les GCs contribuent à l'augmentation de la forme majoritairement active T_3 dans les cellules. Il est cependant à noter, que les traitements hormonaux utilisés ici n'impliquent pas la T_4 . Les effet transcriptionnels sur la DIO2 sont donc, dans ce modèle, probablement le reflet de boucles de rétro-contrôle, mais ne vont pas participer à la potentiation de l'effet des HTs.

Métabolisme intracellulaire des glucocorticoïdes Compte tenu que les GCs peuvent agir *via* les MRs, certains tissus comme les reins présentent une forte expression basale de 11- β -HSD2 afin de prévenir les effets de la CORT *via* ces récepteurs. Dans les HLB, son expression est réprimée par la T_3 et un co-traitement (la CORT seule n'a pas d'effet). Elle n'est pas exprimée dans le TF. La 11- β -HSD1 est principalement impliquée dans la conversion 11-déhydrocorticostérone (inactive) en CORT. Son expression n'est affectée par aucun traitement dans les HLBs, mais elle est fortement induite dans le TF par la CORT et dans une moindre mesure par la T_3 ($\log_2(FC) = 2.48$ et $\log_2(FC) = 0.95$ respectivement). Le co-traitement induit une expression moindre que lors du traitement à la CORT seule.

Ces résultats suggèrent des dynamiques de régulation de l'activation des GCs

différentes selon les tissus : dans les HLBs, contrairement au TF, l'inactivation potentielle de la CORT va être empêchée par la T_3 , ce qui pourrait en partie expliquer l'effet très modeste de la CORT seule sur ce tissu.

Dans le TF mais pas dans les HLBs, la T_3 favorise l'expression de la 11- β -HSD1. Contrairement à DIO2 dont l'activité activatrice est unidirectionnelle, celle de la 11- β -HSD1 est bidirectionnelle, et cette dernière peut aussi présenter une activité réductase (inactivante). Il n'est par conséquent pas à exclure que l'augmentation de son expression dans le TF sous l'effet de la T_3 contribue à l'inactivation de la CORT et à une partie de "l'antagonisme" par les HTs des effets médiés par les GCs. En effet, dans le TF, un total de 63 gènes présentent un profil d'expression où l'effet inducteur ou répresseur de la CORT est inhibé par le traitement à la T_3 .

9.1.3.3 Récepteurs

Enfin, dans le cadre des effets génomiques de ces deux hormones, les actions de ces dernières sur la transcription de gènes cibles nécessitent la présence de leur récepteurs nucléaires respectifs.

Récepteurs aux hormones thyroïdiennes Les deux récepteurs aux HTs, $TR\alpha$ et $TR\beta$ sont exprimés dans les deux tissus étudiés. Leur expression est fortement induite par la T_3 confirmant les résultats obtenus dans littérature. La CORT n'a que peu d'effet sur l'expression de ces deux gènes et n'affecte que marginalement l'expression de $TR\alpha$ dans les HLBs, suggérant que les effets des GCs sur la signalisation thyroïdienne ne passe par une régulation de la quantité de récepteurs, du moins dans les deux tissus étudiés ici. Ceci contraste avec des observations précédente dans d'autres modèles que les GCs sont capables d'induire la transcription de $TR\beta$ (Montesinos *et al.*, 2006).

Récepteurs aux corticostéroïdes GRs et MR sont exprimés dans les deux tissus. Le niveau d'expression de GR n'est cependant pas régulé, ni par la T_3 ni par la CORT. Au contraire, l'expression de MR est fortement induite dans les deux tissus par la T_3 ($\log_2(FC) = 2.32$ dans les HLBs et $\log_2(FC) = 1.97$ dans le TF). La CORT n'a cependant pas d'effet sur ses niveaux de transcrits.

Le fait que dans les HLBs la 11- β -HSD2 soit réprimée et que l'expression de MR soit induite par la T₃ suggère que dans ce tissu, la corticostérone pourrait médier une partie de ses effets *via* MR. Des analyses complémentaires mériteraient d'être menées afin d'éclaircir ce point. En particulier, l'utilisation d'analogues des GCs ou des MCs spécifiques de chaque récepteur et des ChIPs (chromatin immunoprecipitations) dirigées contre MR ou GR pourraient renseigner sur la spécificité d'action de la corticostérone, de GR et de MR. Malheureusement, des anticorps gracieusement prêtés par R. Denver (Université du Michigan, USA) ne se sont pas révélés suffisamment spécifiques pour détecter un enrichissement de signal en ChIP-qPCR conventionnelle. Il pourrait être envisageable d'utiliser des anticorps dirigés contre ces deux récepteurs étiquetés, au risque d'affecter la physiologie du système biologique.

Pour conclure sur ces aspects, l'effet potentiateur des GC sur l'induction de la transcription HT-dépendante des transporteurs, ainsi que la répression relative de l'expression de DIO3 suggère une accumulation de HTs actives au sein des cellules cibles qui pourrait en partie expliquer les profils de type "potentiation". Dans les deux tissus les récepteurs spécifiques des différents ligands sont présents, renforçant l'idée que les tissus sont compétents pour répondre aux deux signaux hormonaux. Enfin, concernant spécifiquement les GC, il est intéressant de noter que dans les HLBs, une partie des effets de la CORT pourrait être véhiculée par MR. Cet aspect est d'autant plus intéressant qu'il est connu qu'en liant GR ou MR, la CORT ne va pas avoir le même répertoire de gènes cibles.

Un autre niveau où les deux signaux hormonaux peuvent interagir et ainsi affecter les niveaux d'expression de leurs gènes cibles est dans la manière dont les TRs et les GRs vont moduler l'expression d'un gène cible : leurs mécanismes d'action moléculaires.

9.2 Profils d'expression et mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux corticostéroïdes

Il est très difficile d'établir un lien entre le mécanisme d'action des TRs ou GRs et les profils d'expression que nous avons mis en évidence. En effet, nous n'avons pas les informations permettant de distinguer les gènes cibles directs des gènes cibles indirects parmi les gènes des différents profils d'expression que nous avons observé. C'est à dire distinguer entre les gènes dont la régulation nécessite l'intervention des TRs ou des GRs directement sur leur niveau de transcription et les gènes dont la transcription est modulée par un autre facteur de transcription qui lui aura été préalablement sous le contrôle des TRs ou des GRs. Cependant, dans les différents profils d'expression que nous observons, il est fortement probable qu'un certain nombre de gènes soit directement sous le contrôle des TRs et des GRs. En effet, même si leur nombre est faible, les gènes connus pour être régulés directement par les TRs (TR β , KLF9 et TH/bZIP (facteur de transcription avec une glissière à leucine basique induit par les HTs, "thyroid hormone induced basic leucine zipper transcription factor")) et les GRs (KLF9, PEPCK) le sont aussi dans nos travaux. De plus, les TRs et les GRs ont des effets versatiles. Ils sont capables à la fois d'activer ou de réprimer la transcription de gènes cibles en présence de leur ligand. Il y a donc des gènes cibles activés et des gènes cibles réprimés par le ligand lié à son récepteur. En général, le nombre de gènes associé à ces catégories reflète une action majoritairement activatrice des HTs (77 %) et répressive des GCs (57 %), ce qui est en accord avec des données de puces à ADN obtenues au laboratoire et avec la littérature (Das *et al.*, 2006).

Il ne nous est pas possible de corréliser ces mécanismes d'action et les profils d'expression que nous observons. Mais, il ressort que le nombre de profils observés suggère plusieurs mécanismes différents pour expliquer qu'une hormone agisse sur l'expression d'un gène et que la seconde puisse affecter ce mécanisme. Il est possible de subdiviser les types de profils correspondant à une "potentiation" ou à un "antagonisme" (indépendamment du sens des variation de niveau d'expression)

sur la base du type de réponses aux hormones. Dans les cas de “potentiation”, le gène peut répondre à chaque hormone seule, le co-traitement révélant un effet additif ou synergique. Le gène peut aussi ne répondre qu’à une seule des deux hormones seules, l’aspect potentiateur du co-traitement correspondant alors à une synergie d’action.

De la même manière, dans le cas d’antagonismes, deux scénarios apparaissent. Dans le premier, l’effet d’une des deux hormones sur la transcription du gène cible est annulé par la seconde sans que cette dernière n’ait d’effet par elle-même. Dans le second scénario, la transcription du gène cible va être modulée par chaque hormone indépendamment et dans des sens opposés. En présence des deux hormones, la variation de transcrit sera le reflet d’une variation intermédiaire entre les effets de chaque hormone.

Pour les gènes activés par les ligands, il y a peu de mécanismes décrits dans la littérature : un mécanisme pour les TRs et trois pour les GRs (voir respectivement Figure 1.8 et Figure 2.10 *a*, *e* et *g*). Il existe aussi quelques variations autour de ces mécanismes permettant un niveau de finesse supérieure dans la régulation (vitesse de réponse, niveau de réponse). Pour les TRs, il a été observé que ces variations fines font intervenir, en fonction du gène cible, des différences de recrutement des récepteurs dépendant de la structure de la chromatine au niveau du site de fixation à l’ADN (Bilesimo *et al.*, 2011) et des recrutements de co-régulateurs spécifiques (Havis *et al.*, 2003). Un exemple bien connu de gène activé par les deux ligands est le gène KLF9 qui possède un élément régulateur composite permettant aussi bien la fixation de TR que celle de GR pour induire la transcription.

Quand le récepteur et son ligand sont des répresseurs de la transcription, il y a bien plus de mécanismes d’action proposés (voir respectivement pour TR et GR, Figure 1.9 et Figure 2.10) mais pour lesquels le détail est moins précis que pour la première catégorie (particulièrement pour les TRs).

Dans le cas des profils d’ “antagonisme”, il est possible de spéculer que des régulations opposées par chaque hormone s’annulant dans le cas d’un co-traitement pourraient avoir plusieurs origines :

- La compétition entre TR et GR pour un même élément de réponse qui provoque le recrutement de co-activateurs et de co-répresseurs respectivement

(ou l'inverse).

- La liaison de TR et GR au niveau d'éléments de réponse distincts et ayant des effets opposés sur la transcription du gène cible.
- Enfin, il n'est pas possible d'exclure la possibilité que des populations de cellules différentes pourraient n'être compétentes qu'à une seule de chaque hormones, l'annulation des effets étant due au fait que la quantité de transcrits mesurée est une moyenne de l'état transcriptionnel de populations différentes.

L'autre type d' "antagonisme" (annulation ou réduction de l'effet de la première hormone sans que la seconde n'ait d'effet seule) peut s'expliquer par les mécanismes suivants :

- La séquestration de co-régulateurs par un des deux récepteurs, prévenant le recrutement de ces co-régulateurs par le second récepteur.
- Compétition pour un même élément de réponse, mais *via* lequel un seul des deux récepteurs module l'expression du gène.

De même, il est possible d'attribuer aux HTs et aux GCs des mécanismes variés pour expliquer les effet de "potentiation" de leur action respective :

- Relargage de co-régulateur séquestrés par un des deux récepteurs en absence d'hormone.
- Synergie de recrutement de co-régulateur via la fixation à des éléments de réponse distincts ou à un même élément de réponse.

Enfin, il intéressant de noter que d'autres facteurs de transcription tels que les STAT (notamment STAT-5 et STAT-6) et NF- κ B sont régulée par les les HTs et les GCs. Il est bien connu que les GCs interagissent avec ces facteurs (Stöcklin *et al.*, 1996). Il est possible d'imaginer que non-seulement les HTs (*via* TR) pourraient contribuer à titrer ces interactions en modulant l'expression de ces facteurs de transcription, mais que les TRs eux mêmes pourraient entrer en compétition pour ces facteurs.

Fonction moléculaire des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes

10.1 Comparaison avec des données similaires

L'étude des effets des HTs et des GCs sur le transcriptome dans le contexte de la métamorphose présentés ici ne sont pas les premières publiées. Kulkarni et Buchholz (2012) ont étudié les effets de ces deux hormones sur le transcriptome de queues de têtards traités ou non à la T_3 et / ou à la CORT. Il est à noter que les conditions expérimentales employées ne sont pas identiques à celles utilisées dans le cadre de mon doctorat. En particulier, ils mesurent les variations de quantités de transcrits dans la queue entière, et pas seulement l'épiderme. Ils utilisent en outre des concentrations de T_3 5 fois supérieures à celles utilisées ici (50 nM vs 10 nM). La concentration en CORT est cependant la même que celle que nous avons utilisée. Enfin, la technologie employée est différente (puce à ADN dans leur cas). L'ensemble de ces différences rend la comparaison directe de nos résultats avec les leurs très délicate.

Dans cet article, les auteurs trouvent ~ 4500 gènes régulés par la T_3 et la CORT, comparé à ~ 3200 après traitement à la T_3 seule et ~ 1900 après un traitement

aux GCs seuls. Cela contraste fortement avec le nombre de gènes obtenus dans nos résultats (5 à 10 fois moins de gènes selon les conditions).

Les différences entre les deux études peuvent s’expliquer notamment par l’utilisation de plate-formes et de démarche de traitement des données différentes :

- Les puces à ADN sont très bruitées comparé au RNA-Seq (voir démarche expérimentale). De plus les corrélations des données de puces (générées au laboratoire) et de RNA-Seq sont de l’ordre de 0,7 à 0,8. Pour comparaison, la corrélation entre les données que j’ai généré et des données de RNA-Seq produites au laboratoire avec une technologie différente – SOLiD (séquençage par ligation et détection d’oligonucléotides, “sequencing by oligonucleotide ligation and detection”) – est de l’ordre de 0,85 à 0,95. Ainsi, les biais propres à chaque technologie rend leur comparaison directe difficile.
- Dans l’article, les auteurs ne se sont basés que sur la p -value de l’analyse différentielle pour classer les gènes en fonction du type de profils d’expression. Nous avons vu que cette approche est discutable en raison du faible pouvoir statistique des données à haut débit (puces à ADN et NGS confondues). Les catégories de gènes définies dans l’article sont donc bruitées et correspondent plus à une description “technique” des résultats qu’à une description des différents profils d’expression des gènes.
- L’utilisation de tissus différents. (Kulkarni *et al.*, 2011) utilisent la queue entière alors que nous nous sommes focalisés sur l’épiderme caudal. Nous avons en outre effectué les traitements sur des cultures organotypiques de queues ou de HLBs et sur des têtards entiers. Ceci nous permet d’une part de prendre en compte des effets centraux possibles, d’autre part, de tenir en compte d’éventuels effets dus aux conditions de culture.

10.2 Spécificité fonctionnelle de certains profils

La majorité des effets communs aux deux tissus concernent le système immunitaire et le remodelage de la matrice extracellulaire. Cependant, leur “implémentation” en terme de réseaux de gènes impliqués, peuvent avoir une forte composante spécifique de chaque tissu.

10.2.1 Rôle sur le système immunitaire

Aussi bien dans le TF que dans les HLBs, il est frappant de constater qu’une composante bien spécifique de la réponse immunitaire est affectée. Il est bien connu que les GCs ont une forte action anti-inflammatoire, et cet effet se retrouve à travers les gènes affectés par ce traitement hormonal. C’est le cas notamment de NF- κ B, NCF-1, CD40, ou IRF-7. L’annotation manuelle et l’annotation automatisée des catégories fonctionnelles convergent toutes deux vers une action additive ou synergique des HTs et des GCs sur la répression de gènes du système immunitaire. Il est intéressant de noter que durant la métamorphose, le têtard va subir un remodelage du système immunitaire (Du Pasquier *et al.*, 1989; Flajnik *et al.*, 1987), et que les GCs y jouent un rôle important (Rollins-Smith *et al.*, 1997). Dans le contexte des travaux présentés ici, il semblerait que la perturbation de la signalisation thyroïdienne en réponse à un stress ait deux effets complémentaires sur le système immunitaire : non seulement cette interaction favorise un processus déjà initié par les HT visant à “éteindre” le système immunitaire inné, mais elle peut aller à l’encontre de l’effet des HT en inhibant leur action pro-inflammatoire. Les profils d’expression de deux interleukine impliquées dans l’inflammation – IL8, médiateur important de l’inflammation et IL1B, précurseur de CASP1 – illustrent ce dernier point. Elles sont en effet induites par les HTs (uniquement dans les HLBs), mais cet effet est antagonisé par les GCs, qui répriment leur expression aussi bien lors d’un traitement à la CORT seule (effet déjà décrit, Nissen, 2000) que combiné à la T₃.

Dans des modèles de tissus nerveux mammaliens, les HTs ont également été rapportées comme pro-inflammatoire (Tamura *et al.*, 1999; Montesinos *et al.*, 2012) (bien que passant par IL12, un gène n’ayant pas d’orthologue chez le Xénope). Cette action pro-inflammatoire des HTs peut également passer par l’interaction avec STAT-5 (Favre-Young *et al.*, 2000), dont l’expression est réprimée lors d’un co-traitement, suggérant que les GCs pourraient agir à ce niveau. Il est connu que les GCs sont aussi capable d’interférer avec le rôle immunostimulant des HTs, notamment via l’augmentation de cytokine pro-résolutives comme IL10 (Montesinos *et al.*, 2012). Cet effet *via* IL10 n’est cependant pas observé dans notre modèle (IL10 n’étant pas exprimé, quelle que soient les conditions), suggérant que ce mécanisme

n'a pas lieu chez le Xénope ou que les acteurs moléculaires qui le sous-tendent n'ont pas été caractérisés. En revanche l'expression de son récepteur IL10RA est fortement réprimée par les GCs et d'autant plus dans le cas d'un co-traitement avec les HTs, suggérant que si d'autres interleukines ont la capacité de se fixer sur IL10RA, leurs effets biologiques seront au moins partiellement inhibés. Il est de plus intéressant de remarquer que IL17 (une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans de nombreuses maladies autoimmunes dont l'arthrose rhumatoïde, Onishi et Gaffen, 2010) et ses récepteurs (IL17RA et IL17RE) sont réprimées par les GCs et d'autant plus lors d'un co-traitement avec des HTs. Les HTs seules ne répriment, dans une moindre mesure, l'expression de IL17RE que dans les HLBs. Ceci suggère que les GCs sont capables d'amplifier un effet anti-inflammatoire des HTs d'une façon spécifique des tissus.

D'autres facteurs impliqués dans la réponse immunitaire innée sont affectés. En particulier, CD40, un facteur ayant un rôle de "pont" fonctionnel entre la réponse immune innée et acquise (Elgueta *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2004) réprimé par les HTs et les GCs indépendamment, l'est fortement lors d'un co-traitement. La répression forte de ce récepteur lors d'un co-traitement suggère que l'interaction entre les deux voies de signalisation étudiées contribue à une désensibilisation à ce facteur. Il est à noter que la façon dont ont été traitées les données de RNA-Seq ne permettent pas de mesurer les niveaux d'expression du ligand de CD40 (CD40lg) car le gène chevauche entièrement ARHGEF6.

Enfin, on notera que SOCS2 est régulé de façon très différente selon les tissus. Dans les HLBs, son expression est induite par les HTs, alors que dans le TF, son expression est réprimée par les GCs, et de façon potentiée lors d'un co-traitement. Le produit de ce gène est impliqué dans le rétrocontrôle négatif qui régule la transduction du signal des cytokines. Il semblerait en particulier qu'il soit un régulateur négatif de la voie IGF1. Ses profils d'expression dans les deux tissus peut laisser penser que dans les HLBs, son induction par les HTs va contribuer à un contrôle de l'inflammation. En revanche dans le TF, où son expression est fortement réprimée par les HTs et les GCs, pourrait contribuer à l'emballage de l'inflammation dans un tissu en cours de résorption. Cet exemple illustre parfaitement la spécificité tissulaire de l'action des GCs sur les processus

d'inflammation.

10.2.2 Matrice extracellulaire

La régression de la queue et la croissance des pattes postérieures sont des processus qui font appel à des mécanismes cellulaires communs. En particulier, une réorganisation profonde de la structure fine de ces organes à lieu, notamment via le remodelage de la matrice extracellulaire, et l'établissement de nouvelles structures kératineuses (Schreiber et Brown, 2003). Ce dernier point est appuyé par le fait que la structure de l'épiderme est un autre aspect à être profondément remodelé au cours de la métamorphose. De nombreux travaux ont déjà pointé le rôle important des HTs dans la régulation de gènes codant pour des métalloprotéinases et des collagénases (Jung *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007). Les données présentées ici confirment le rôle des HTs dans l'induction de la transcription de nombreux membres de ces familles, notamment MMP3, MMP13, KRT17 (impliquée dans la modulation de $\text{TNF}\alpha$ *via* les voies Akt/mTOR; son expression est potentiée lors d'un co-traitement dans les HLBs), KRT15 (fortement réprimée par les HTs), KRT79 (fortement exprimée dans les HLBs et associée à un profil d'expression de type "potentiation", mais pas exprimée dans le TF) et PAPP2 (impliquée dans le remodelage de la matrice et régulée de manière opposée par les HTs et les GCs). Ces quelques cibles spécifiques d'un tissu ou sous l'effet d'une régulation croisée entre les deux hormones permettent déjà de mettre en avant un rôle terminal hautement tissu spécifique des HTs. De plus, comme illustré dans le cas de PAPP2, la régulation de la balance entre HTs et GCs pourrait avoir des conséquences locales sur la structure de la matrice.

L'importance de l'intégrité de la matrice extra-cellulaire ne se limite cependant pas uniquement à un rôle structural. En effet, la matrice va au moins en partie déterminer un certain nombre d'interactions entre cellules, orientant ces dernières vers des phases précises du cycle cellulaire. Un facteur en particulier, CEBP α , semble impliqué dans le lien entre structure de la matrice et cyclage des cellules (Rana *et al.*, 1994). Les auteurs suggèrent dans cet article que la contribution de l'intégrité de la matrice sur l'entrée des cellules en G0, et sur les processus d'arrêt de croissance et de différenciation en général, nécessiteraient des niveaux élevés

de CEBP α . De façon intéressante, le gène codant pour ce facteur est fortement induit dans le TF et les HLBs sous l'effet de la T₃. Additionnellement, dans les HLBs mais pas dans le TF, l'induction T₃-dépendante est potentiée par la CORT. Enfin, il a été montré que l'action anti-proliférative de CEBP α se faisait en partie par l'inhibition directe de CDK2 (Wang *et al.*, 2001) dont l'expression est réprimée de façon “potentiée” dans le TF. L'expression accrue de CEBP α lorsque les deux hormones sont présentes dans les HLBs pourrait donc contribuer à la différenciation précoce des structures et à la longueur finale réduite des membres postérieurs classiquement observée lors d'une métamorphose accélérée ou induite chez le Xénope (Gomez-Mestre *et al.*, 2013) et d'autres anoures. Ceci concorderait également avec les résultats obtenus au niveau de l'ossification prématurée du squelette suite à un traitement combiné avec les deux hormones. Dans le TF, ce profil d'expression de CEBP α associé à la répression de facteurs pro-proliférateurs tels que CDK2 pourrait être un mécanisme général d'arrêt de la prolifération dans un tissu en cours de résorption

10.2.3 Possibles effets à l'échelle du tissu

Par leurs actions croisées sur la matrice extra-cellulaire et le système immunitaire, les HTs et les GCs peuvent moduler des phénomènes biologiques plus généraux. Par exemple, le remodelage de la matrice et les communications de cellule à cellule vont être importantes dans des processus développementaux tels que l'angiogenèse. L'influence de ces deux hormones sur le système immunitaire va quant à elle potentiellement affecter des tissus particulièrement sensibles à des pathologies auto-immunes comme les intestins ou les articulations (arthrose rhumatoïde ou ostéoarthrite). Ces deux processus ne sont cependant pas disjoints, puisque de nombreuses maladies auto-immunes vont se traduire par une inflammation locale accrue et une dégradation de la matrice extra-cellulaire. Ces effets peuvent s'expliquer en partie par les mécanismes d'action génomiques de ces deux hormones. De plus, la métamorphose a jusqu'à présent été décrite comme un phénomène impliquant les voies génomiques des HTs sur la base de l'observation que TR était indispensable (Das *et al.*, 2010). Alors que les effets génomiques sont indéniablement nécessaires aux effets majeurs des HTs, il est envisageable que leurs effets

par des voies non-génomiques soient des facettes importante de la régulation fine des phénomènes biologiques qu’elles régulent. Les effets non-génomiques, historiquement associés à des effets à court terme et indépendants des TRs, ont récemment été montrés comme associés à des processus développementaux plus longs, impliquant potentiellement certaines isoformes de TR ou certaines modifications post-traductionnelles de TR (Davis *et al.*, 2005), et se traduisant – bien qu’indirectement – par une réponse au niveau du transcriptome (Davis *et al.*, 2011). Par ailleurs, cette voie non-classique de l’action des HT semble importante dans le cadre de l’angiogenèse (Bergh *et al.*, 2005), et agit notamment au niveau des mitochondries et du cytosquelette (Leonard et Farwell, 2006; Siegrist-Kaiser *et al.*, 1990). Ces fonctions biologiques sont enrichies parmi les gènes cibles d’interactions entre HT et GC.

Dans ce contexte, il est important de mentionner que deux gènes, MFGE8 et TNC (tenascine C), dont l’effet des HTs est respectivement antagonisé et potentié par les GCs, sont impliqués dans la signalisation du récepteur membranaire $\alpha_V\beta_3$ (Sriramarao *et al.*, 1993; Aziz *et al.*, 2009). Il se pourrait donc que des interactions croisées entre voies génomiques et non-génomiques complexifient le paysage des fonctions biologiques régulées par les HTs et les régulations croisées entre ces dernières et les GCs.

Conséquences fonctionnelles dans l'interaction avec l'environnement

11.1 Conséquences en terme d'adaptation

Jusqu'à présent, l'étude des régulations croisées entre HTs et GCs ont essentiellement été menées d'un point de vu biochimique (Kikuyama *et al.*, 1982; Galton, 1990), moléculaire à l'échelle de quelques gènes (Bagamasbad *et al.*, 2008; Krain et Denver, 2004; Gil-Ibáñez *et al.*, 2014) et histologique (Denver, 1993). Ce n'est que très récemment que ce sujet d'étude à commencé à bénéficier des techniques de mesure de l'expression de gènes à grande échelle. La littérature reste cependant sommaire à ce sujet, et les liens entre les interactions moléculaires, les fonctions des gènes associés et leurs conséquences phénotypiques ne sont pas pleinement abordés.

Le travail présenté dans ce manuscrit peut être interprété dans le contexte des conséquences d'un stress sur le développement post-embryonnaire. Les données présentées ici montrent qu'une partie des gènes régulés par les HTs le sont également par les GCs lors d'un co-traitement. Mais il ressort aussi que certains gènes régulés par les HTs subissent un effet antagoniste des GCs. Les conséquences fonctionnelles sont potentiellement importantes, puisque l'action des GCs ne va pas simplement potentialiser la signalisation thyroïdienne (expliquant en partie l'accélération de la

métamorphose), mais va également interférer avec celle-ci. C'est une illustration typique de la robustesse des réseaux biologiques où un processus biologique suit son cours malgré des conditions adverses (Kitano, 2004).

Les fonctions physiologiques intégratives et en particulier la voie GCs de réponse au stress peuvent jouer un rôle essentiel dans la capacité des vertébrés à faire face aux changements globaux et aux environnements adverses tout en maintenant leur homéostasie (Angelier et Wingfield, 2013). Dans ce cas, la survie immédiate peut avoir lieu au détriment d'autres fonctions biologiques comme par exemple la reproduction. Ces mécanismes adaptatifs sont malgré tout flexibles et leur rapport coût/bénéfice peut être ajusté par un rhéostat physiologique. Par exemple, ce phénomène a déjà été observé chez le Xénope où la combinaison de stress de nature différente (variations de température et accessibilité réduite à la nourriture) entraîne des variations dans le minutage de l'ossification, produisant ainsi des juvéniles de petite taille et dont le squelette présente des défauts d'ossification (Gomez-Mestre *et al.*, 2010). Dans le cadre des traitements que nous avons réalisés sur l'animal entier, nous avons aussi pu observer une ossification prématurée qui reflète les altérations du transcriptome que nous avons caractérisées.

De plus, certains gènes régulés par les GCs sont antagonisés par les HTs, suggérant que la réponse physiologique à un agent stressant va potentiellement différer selon le statut thyroïdien de l'individu ou son stade de développement post-embryonnaire. Il reste cependant difficile de spéculer sur cet aspect compte tenu qu'un seul type de traitement aux HTs a été effectué.

Il est tentant de faire le parallèle entre la balance coût/bénéfice des phénomènes adaptatifs au niveau écologique et les réponses moléculaires obtenues en laboratoire. Ils se placent à des niveaux de résolution et des échelles très différentes qui rendent toutes comparaisons hasardeuses. Tout au plus nous proposons des pistes qui permettraient de décrire des réponses moléculaires à certains stress (que nous ne connaissons pas).

11.2 Stress et épigénome

Il a été montré que les effets délétères d'un stress appliqué durant le développement post-embryonnaire pouvaient se manifester sous la forme de pathologies à l'âge adulte (par la reprogrammation métabolique, Drake *et al.*, 2012; Begum *et al.*, 2013 ou la reprogrammation du rhéostat de la réponse aux stress, Weaver *et al.*, 2004). Nous avons pu mettre en évidence que l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le dépôt et la lecture de modifications de la chromatine (aussi bien la méthylation de l'ADN que la modification post-traductionnelle des queues d'histone) pouvait être régulée par les HTs et les GCs. Il est bien caractérisé que la méthylation est indispensable au cours du développement précoce et de la différenciation cellulaire (Monk *et al.*, 1987; Meissner *et al.*, 2008). L'expression de MECP2 (impliquée dans la lecture de l'ADN méthylé, Zou *et al.*, 2012) est réprimée par la T₃ et la CORT et présente une légère potentiation de cet effet lorsque les deux hormones sont présentes. La biologie de ce facteur est complexe, et il est difficile de tirer des conclusions sur sa fonction fine à l'échelle de l'organisme sur la base de son profil d'expression. Nous savons cependant que sa mutation provoque le syndrome de Rett (Amir *et al.*, 1999). De plus, UHRF1 (impliqué dans la maintenance de la méthylation de l'ADN, Bostick *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013) voit son expression réprimée par la T₃ et la CORT. Son expression est fortement réprimée lorsque les deux hormones sont présentes. Enfin, nous pourrions noter que APOBEC2 (impliqué dans les processus de déméthylation dépendants de l'hydroxyméthylation; Guo *et al.*, 2011), est induit par la T₃ dans le TF mais pas dans les HLBs. Ceci suggère une spécificité tissulaire de la dynamique de méthylation de l'ADN, avec une déméthylation de l'ADN accrue dans la queue.

La baisse de l'expression de UHRF1 pourrait ainsi provoquer une perte d'une partie de la méthylation lors de la mitose puisque DNMT1 (ADN méthyltransférase 1, "DNA methyltransferase 1") ne sera plus adressé au niveau de sites hémi-méthylés au cours de la réplication. Certains sites méthylés seront donc déméthylés et les gènes affectés par ce changement pourront être régulés différemment. Nous avons aussi observé que l'expression de DNMT3A est induite par les HT, suggérant une méthylation *de novo* au niveau de certains sites. Il semblerait toutefois que DNMT3A

soit aussi impliqué dans la déméthylation (Wu et Zhang, 2010). Cependant, cette activité nécessite de faibles taux de SAM (S-adenosyl méthionine), le substrat de DNMT3A, condition qui ne semble pas satisfaite dans notre modèle à la vue de l'expression des enzymes permettant sa synthèse. Des mesures directes seront cependant nécessaires pour apporter une réponse définitive.

L'ensemble de ces résultats suggère deux caractéristiques fondamentales de la métamorphose. Tout d'abord, dans le cas d'une métamorphose ayant lieu dans des conditions "normales", les HTs vont être responsables de l'induction des enzymes nécessaires au dépôt de la méthylation (DNMT3A). Parallèlement, les enzymes nécessaires à la maintenance de la méthylation de l'ADN (UHRF1) et à la lecture de l'information véhiculée par la méthylation de l'ADN sont réprimées (MECP2 et MBD (protéines à domaine de liaison aux CpG méthylés, "methyl-CpG binding domain protein")²). Ceci laisse penser qu'il y aurait donc une redistribution de la méthylation, afin d'autoriser la transcription de gènes "adultes" jusqu'alors éteints, et de réprimer l'expression de gènes "larvaires". Par simple effet statistique (et si la diminution de l'expression de ces gènes se traduit bien par une diminution de la quantité de protéine correspondante dans la cellule), ceci pourrait introduire une composante stochastique accrue dans les profils de méthylation de l'ADN (Xie *et al.*, 2011; Landan *et al.*, 2012), et par extension, une perte de fidélité dans le maintien de la méthylation de l'ADN. Malgré un écrasement de la variabilité de la réponse inter-cellulaire liée à son intégration au niveau des tissus, cette composante stochastique peut avoir un impact profond au niveau des tissus et de l'organisme dans son ensemble. L'acquisition de lignées cellulaires issues de HLB (Sinzelle *et al.*, 2012) nous permettra d'avoir plus de recul par rapport à ces aspects.

Une altération ponctuelle des niveaux de méthylation pourraient aussi participer à la modulation des balances entre types cellulaires au sein d'un tissu, perturbant potentiellement les fonctions biologiques de ce tissu. Des études complémentaires dans d'autres organes sont nécessaires pour éclaircir ce point.

Bien que les niveaux d'expression de ces trois gènes ne deviennent pas nuls suite à un traitement hormonal, il est possible de spéculer que la déficience du maintien et de la lecture de la méthylation de l'ADN pourrait contribuer à une sensibilité accrue aux signaux environnementaux et à la re-programmation du génome. Nous

savons qu'une partie de la diversité phénotypique au sein d'une population repose sur une variabilité génétique. Ces résultats suggèrent que d'autres composantes pourraient entrer en jeu. En particulier, une variabilité des profils d'expression de gènes pouvant être aggravée par des facteurs environnementaux pourrait être à l'origine de phénotype moléculaires altérés se traduisant à plus ou moins long terme par des phénotypes macroscopique ou physiologiques particuliers.

Conclusions et Perspectives

12.1 Conclusions

L'ensemble de ce travail a permis la caractérisation détaillée des effets transcriptomiques des régulations croisées entre les HTs et les GCs. Il en ressort trois points majeurs.

Tout d'abord, il apparait que les interactions entre les deux hormones résultent en une diversité limitée des profils d'expression des gènes régulés. Deux catégories principales émergent, indépendamment du sens de la régulation et du tissu étudié : Certains gènes voient leur expression potentiée lors d'un co-traitement, tandis que d'autres sont associés à un effet antagoniste d'une hormone sur l'autre.

Ensuite, ces types d'interactions sont caractérisés par des fonctions biologiques communes au TF et aux HLBs, incluant une modulation de la biologie des tissus conjonctifs et du système immunitaire. En revanche, de façon surprenante, en particulier concernant le système immunitaire, les réponses biologiques présentent, face à ces deux signaux hormonaux, une grande spécificité tissulaire.

Enfin, les GC semblent interférer avec des processus de méthylation de l'ADN, potentiellement en affectant son maintien et sa lecture, et en provoquant une redistribution de cette marque. Les conséquences pourraient être une variabilité accrue de la réponse, contribuant ainsi pour l'individu à la flexibilité phénotypique et à l'échelle d'une population, à la diversité de phénotypes.

12.2 Perspectives

L'utilisation du RNA-Seq s'est révélée dans le cadre de ce projet, particulièrement enrichissante pour aborder l'analyse de programmes de régulation croisées entre les HTs et les GCs. Toutefois, il est difficile de tirer des conclusions définitives sur la biologie fine qui a lieu. Les données sur le TF restent pour le moment très descriptives. Pour aller plus loin, il serait nécessaire de compléter ces résultats par des analyses fonctionnelles. De plus, dans le cadre d'une collaboration avec D. Buchholz (Université de Cincinnati, USA), nous avons réalisé la mesure des variations de quantité de transcrits par RNA-Seq dans le foie de têtards pré-métamorphiques traités aux HTs et aux GCs. Il sera notamment intéressant de comparer la signature transcriptionnelle des interactions entre HTs et GCs et s'il existe aussi une réponse immune spécifique de ce tissu. Nous pouvons nous attendre à ce que le métabolisme soit affecté par ces traitements ; ce travail permettrait donc d'en caractériser les bases moléculaires.

En outre, bien que mon travail mette en valeur les modalités d'interactions entre ces deux hormones et leurs effets sur le transcriptome, tout reste à faire en ce qui concerne l'élucidation des détails mécanistiques qui sous-tendent ces interactions croisées. La tâche est d'autant plus difficile qu'à la vue de nos résultats, il semblerait qu'une grande diversité de mécanismes soient impliqués, de la compétition pour des co-régulateurs à une action synergique en *cis* en passant par des voies non-génomiques.

Une voie d'approche possible pour caractériser ces mécanismes est de décrire la dynamique des intermédiaires moléculaires impliqués dans la régulation de la transcription, comme par exemple les modifications post-traductionnelles des histones. Les marques H3K4me1 (mono-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3) et H3K4me3 (tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3) sont associées à l'activation d'éléments *cis*-régulateurs au niveau de "enhanceurs" et de promoteurs, dont l'état de méthylation peut influencer sur la transcription des gènes sous leur contrôle. J'ai donc initié leur cartographie par ChIP-Seq. Sont présentés Figure 12.1 des données préliminaires incluant les profils de densité de la mono- et tri-méthylation d'H3K4 (lysine 4 de l'histone H3), de H3, et de TR dans les HLBs. Ces données apporteront

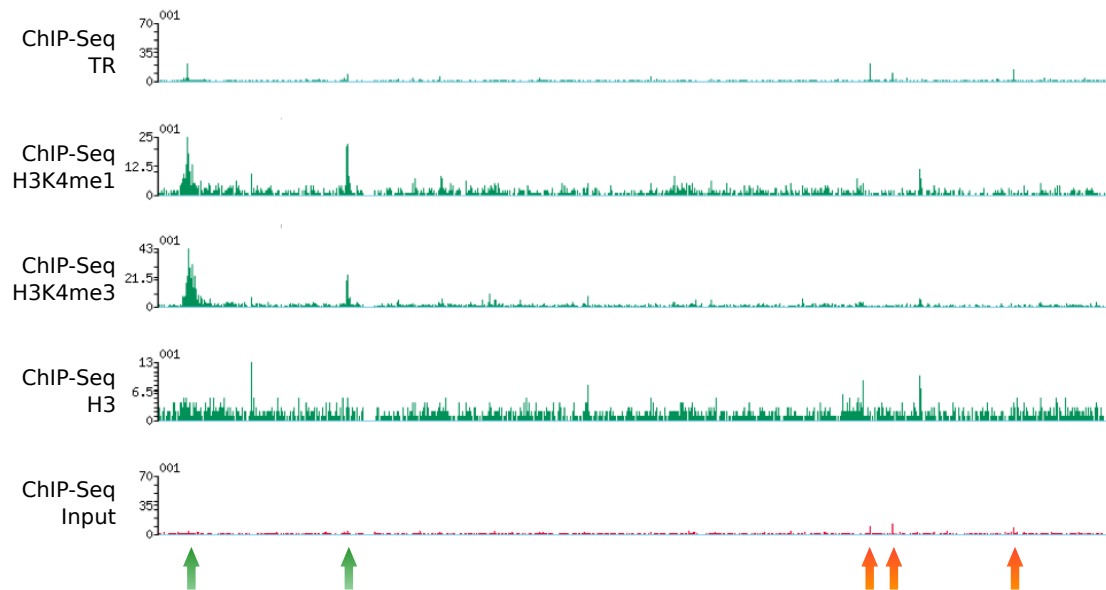


FIGURE 12.1 — Profils de densité de ChIP-Seq pour la mono- et la tri-méthylation d’H3K4 au niveau du locus de TR β . Deux sites de liaison de TR concordent spatialement avec un enrichissement de H3K4me1 et H3K4me3 (flèches vertes). À noter que trois pics correspondent à du bruit de fond et sont retrouvés également dans l’“input” (flèches rouges).

également des informations supplémentaires sur la concomitance de la méthylation d’H3K4 et la liaison de TR, ce qui avait déjà été observé au niveau de deux gènes (Bilesimo *et al.*, 2011).

Parmi la multitude de résultats que j’ai obtenus, il apparaît une composante forte associée à la modulation de la méthylation de l’ADN. Il reste à ce sujet à déterminer dans quelle mesure d’éventuelles variations des niveaux de méthylation vont affecter certains gènes en particulier ou le génome dans son ensemble, et quelles en sont les conséquences fonctionnelles. Alors que des résultats préliminaires suggèrent que le niveau de méthylation global ne varie pas au cours de la métamorphose, il est prévu de cartographier à l’échelle du génome par MethylCAP-Seq (capture d’ADN méthylé à l’aide d’un domaine MBD et séquençage, “methylated DNA capture by MBD domain and high-throughput sequencing”) et MeDIP-Seq (immunoprécipitation d’ADN méthylé et séquençage, “methylated DNA immunoprecipitation and high-throughput sequencing”) les loci méthylés dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées dans le cadre de ma thèse. Ceci nous permettra de mettre en relation directe les variations d’expression des facteurs impliqués dans la

méthylation de l'ADN et le dépôt effectif de cette marque épigénétique suite aux différents traitements hormonaux. La raison pour laquelle ces travaux n'ont pas été initiés plus tôt se trouve dans la difficulté de distinguer entre méthylation et hydroxyméthylation. La technologie MeDIP-Seq permet l'utilisation d'anticorps spécifiques de l'hydroxyméthylation.

Cinquième partie

Annexes

ANNEXE A

Publications

A- 1 Mécanismes d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes durant le développement : Lessons retenues des études sur les amphibiens

Résumé

Les TRs (récepteurs aux HTs (hormones thyroïdiennes)) jouent un rôle critique durant le développement des vertébrés. Cependant, leur mécanismes d'action *in vivo* reste peu exploré. Cette revue catalogue certains des résultats obtenus dans le contexte de la métamorphose des amphibiens sur les fonctions développementales des HTs et des TRs et leur mécanismes associés.

Un modèle de double fonction de TR pour le développement des Anoures a été proposé il y a près d'une décade. Selon ce modèle, TR non lié à son ligand recrute des complexes co-répresseurs – contenant des désacétylases d'histones – au niveau de gènes cibles des HTs durant la pré-métamorphose pour réprimer l'expression de ces gènes et empêcher la métamorphose prématurée. Par la suite, quand les HTs sont disponibles, TR lié au ligand recrute des complexes co-activateurs – contenant des modificateurs d'histones et des remodeleurs de la chromatine – pour cette fois activer l'expression de ces même gènes et induire les changements associés à la métamorphose. Ces complexes peuvent altérer la structure de la chromatine par déplacement ou éviction des nucléosomes et la modification d'histones, contribuant au recrutement de la machine transcriptionnelle et à l'activation de gènes.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce modèle sont très probablement transposables à des modèles mammaliens.



Review

Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: Lessons from amphibian studies[☆]

Alexis Grimaldi^a, Nicolas Buisine^a, Thomas Miller^b, Yun-Bo Shi^b, Laurent M. Sachs^{a,*}

^a Muséum National d'Histoire Naturelle, Dépt. Régulation Développement et Diversité Moléculaire, UMR7221 CNRS, Evolution des Régulations Endocriniennes, Section on thyroid hormone receptor function and mechanism of action, 57 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France

^b Section on Molecular Morphogenesis, Program in Cellular Regulation and Metabolism, NICHD, NIH, Bldg. 18T, Rm. 106, Bethesda, MD 20892, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2012

Received in revised form 28 March 2012

Accepted 21 April 2012

Available online 28 April 2012

Keywords:

Thyroid hormone

Transcriptional regulation

Histone modification

Chromatin remodeling

Coregulator

Amphibian metamorphosis

ABSTRACT

Background: Thyroid hormone (TH) receptor (TR) plays critical roles in vertebrate development. However, the *in vivo* mechanism of TR action remains poorly explored.

Scope of review: Frog metamorphosis is controlled by TH and mimics the postembryonic period in mammals when high levels of TH are also required. We review here some of the findings on the developmental functions of TH and TR and the associated mechanisms obtained from this model system.

Major conclusion: A dual function model for TR in Anuran development was proposed over a decade ago. That is, unliganded TR recruits corepressors to TH response genes in premetamorphic tadpoles to repress these genes and prevent premature metamorphic changes. Subsequently, when TH becomes available, liganded TR recruits coactivators to activate these same genes, leading to metamorphic changes. Over the years, molecular and genetic approaches have provided strong support for this model. Specifically, it has been shown that unliganded TR recruits histone deacetylase containing corepressor complexes during larval stages to control metamorphic timing, while liganded TR recruits multiple histone modifying and chromatin remodeling coactivator complexes during metamorphosis. These complexes can alter chromatin structure via nucleosome position alterations or eviction and histone modifications to contribute to the recruitment of transcriptional machinery and gene activation.

General significance: The molecular mechanisms of TR action *in vivo* as revealed from studies on amphibian metamorphosis are very likely applicable to mammalian development as well. These findings provide a new perspective for understanding the diverse effects of TH in normal physiology and diseases caused by TH dysfunction. This article is part of a Special Issue entitled Thyroid hormone signalling.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid hormones (TH) regulate multiple developmental and physiological functions in vertebrates. At the cellular level, 3,5,3'

Abbreviations: TH, Thyroid hormone; TR, Thyroid hormone receptor; T₃, 3,5,3'-triiodothyronine; TRE, TH response element; DR, direct repeat; IR, inverted repeat or palindromic; ER, everted repeat; RXR, retinoic acid X receptor; dp, dominant positive; dn, dominant negative; NCoR, Nuclear receptor CoRepressor; SMRT, Silencing Mediator for RAR and TR; ChIP, chromatin immunoprecipitation; HDAC, histone deacetylase; TBL1, transducin beta like protein 1; SRC, steroid receptor coactivator; CBP, p300/CREB binding protein; CARM1, coactivator associated arginine methyltransferase 1; PRMT1, Protein arginine methyltransferase 1; DRIP, vitamin D receptor interacting protein complex; TRAP, TR associated protein complex; ARC, activator recruited cofactor complex; BRG1, Brahma related gene 1; BAF57, BRG1 associated factor 57; HDM, histone demethylase; HAT, histone acetyltransferase; HMT, histone methyltransferase; ezh2, enhancer of zeste 2; H3, histone H3; H4, histone H4; Me2, Dimethyl; Me3, Trimethyl; K, Lysine; R, Arginine; X. laevis, *Xenopus laevis*; X. tropicalis, *Xenopus tropicalis*.

[☆] This article is part of a Special Issue entitled Thyroid hormone signalling.

* Corresponding author at: UMR7221 CNRS, MNHN, CP 32, 7 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France. Tel.: +33 1 40 79 36 04; fax: +33 1 40 79 36 18.

E-mail address: sachs@mnhn.fr (L.M. Sachs).

triiodothyronine (T₃), the active form of TH, controls cell metabolism, proliferation, and commitment to differentiation or apoptosis. TH is synthesized in the thyroid gland. This organ has attracted the attention of physicians since antiquity. It was only 100 years ago that TH had begun to be characterized. In 1912, Friedrich Gudernatsch fed premetamorphic tadpoles with several horse organs and found that thyroid gland but none of the others could accelerate amphibian metamorphosis [1].

Amphibian development is a biphasic process. Embryonic stages and juvenile life are separated by a larval (tadpole) period that ends with metamorphosis. Metamorphosis is a switch that results in the reprogramming of the morphological and biochemical characteristics of nearly all tadpole organs, including *de novo* development (limbs), tissue remodeling (nervous system) and organ resorption (tail) [2]. These transformations involve apoptosis of larval cells and concurrent proliferation and differentiation of adult cell types.

Amphibian metamorphosis bears strong similarities with the perinatal (postembryonic) development in mammals at molecular and morphological levels [3]. First, both take place in a period when plasma TH levels peak during development. Second, both mammals and

(most) anurans change their living habitat during this period, from an aquatic (amniotic) to a terrestrial environment. Third, many processes that occur during anuran metamorphosis resemble those occurring during postembryonic development in mammals [4,2]. These include skin keratinization, the induction of urea cycle enzymes, the switching of the hemoglobin genes from larval (tadpole) or fetal types to frog or adult types, respectively, and the developmental progression and restructuring of the central and peripheral nervous systems, etc. One of the best studied among them is the development of the adult intestine. Recent studies have shown that both the metamorphic intestinal remodeling in *Xenopus laevis* (*X. laevis*) and postembryonic intestinal maturation in mouse are dependent on TH and involve the formation of adult stem cells from pre-existing tadpole/neonatal intestinal epithelial cells [5,6]. Such findings suggest conserved molecular mechanisms governing a TH-dependent postembryonic development in vertebrates. Thus, amphibian metamorphosis can serve as a model to investigate the effects of TH on vertebrate development. More importantly, although TH is clearly important for embryogenesis in humans and other mammals, it has been difficult to investigate the mechanisms in mammals. This is in part due to the difficulty to manipulate the uterus-enclosed mammalian embryos and to separate the direct effects of TH on embryos from the indirect maternal effects caused by TH. The metamorphic changes in tadpoles occur in a free-living organism and can be easily controlled by adding TH or its inhibitors to the rearing water.

The diverse effects of TH suggest the existence of tissue specific and developmental stage specific control of gene expression by TH to coordinate different transformations in various organs. TH can affect gene expression by binding to TH receptors (TRs). TRs are transcription factors that belong to the superfamily of nuclear receptors [7,8]. TH is a versatile player, not only upregulating the expression of some genes but also downregulating expression of other genes. It is generally believed that both effects are mediated by TR. Studies on gene repression by TR in the presence of TH are very limited [9]. To date, most of the studies on the mechanisms of TR action have been carried out on positively regulated TH response genes. Extensive in vitro and cell culture analyses have shown that TRs bind to specific sequences present in the promoter regions of their target genes to regulate their expression. Molecular and genetic studies on postembryonic development in frogs coupled with in vivo analysis in the reconstituted frog oocyte transcription system have provided important insights on transcriptional activation and repression by TR during vertebrate development.

2. Gene regulation by thyroid hormone receptor

During the sixties, J.R. Tata showed that TH induced mRNA and protein synthesis in mammals [10] as well as in amphibians [11]. Several studies in mammals subsequently showed the existence of nuclear binding sites for TH [12] that led to the concept of TR. Later, the isolation of complementary DNA (cDNA) coding for *verba* oncogene from avian erythroblastosis virus led to the cloning of the proto-oncogene *cerbA* that was identified as a TR [13,14]. A few years later the *X. laevis* TR, first from an amphibian, was cloned [15,16].

2.1. Amphibian thyroid hormone receptors

As in mammals there are two types of TR, α and β [16–20]. The amino acid sequences of the amphibian TRs are well conserved in evolution compared to their homologs described in mammals, fishes and chickens. Additionally, alternative splicing yields multiple mRNA isoforms similar to those found in mammals [16].

Xenopus TR, as most other nuclear receptors, can be organized from the amino to the carboxyl terminus into four domains that indicate differing functions, A/B, C, D and E; however, there can be overlap between the functions of each domain. The A/B domain is

generally involved in the transcriptional activation and is highly variable in sequence and length, the shortest being in *X. laevis* TR β 1 where this domain is absent [16]. The recent isolation of TR β 2 from *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*) led to the identification of an A/B domain with high sequence identity to the mammalian domain [LM Sachs unpublished data], further confirming the conservation of this domain's function in some amphibian isoforms.

The C domain is one of the signatures of all nuclear receptors. This highly conserved region is involved in DNA binding and thus in the specific recognition of TH response elements (TRE) present in TH response genes. The consensus TRE consists of two repeats of the hexameric AGGTCA sequence. In mammals, this half site can be configured in direct repeat (DR), inverted repeat or palindrome (IR) and everted repeat (ER). The hormonal specificity is dictated by the number of nucleotide spacing the two half sites as well as its direction. A DR with 4 nucleotide spacing most strongly binds to TR and is thus considered the highest affinity TRE. However, an IR with no nucleotide between the two half sites or an ER with 6 or 8 nucleotide spacing can also function as a TRE. In *Xenopus*, all the identified TREs are DR4 [21]. TRs bind to DNA as monomer, homodimer or heterodimer. The most frequent partner is the retinoic acid X receptor (RXR), a nuclear receptor that binds 9-*cis* retinoic acid. As in mammals, three heterodimeric partners (RXR α , RXR β and RXR γ) have been cloned in *Xenopus* [22,23]. Binding of RXR ligand is not necessary for heterodimerization with TR or response to TH. However, RXR is a critical requirement for the developmental function of TR in amphibian. Without RXR, TR alone has little effect on TH response gene transcription in vivo [24].

The D domain is a hinge region that influences surrounding domains C and E and is involved in nuclear localization. The E domain is a complex region with multiple functions. Aside from its important role in ligand binding, it is also involved in the receptor dimerization (interaction with RXR), transcriptional activation in the presence of ligand and transcriptional repression in the absence of ligand. The E domain also interfaces with transcriptional machinery.

Thus, the amphibian TR behaves similarly to the mammalian and avian TR in terms of their secondary structure organization, ligand and DNA binding properties, and their requirement to heterodimerize with RXR for high affinity DNA binding [25]. Likewise, TH action appears conserved in amphibians. TH is versatile and while most direct target genes are upregulated, TH can also suppress gene expression. However, TR can bind to DNA in the presence and the absence of ligand. In the context of a positive TRE, transcription is activated by TH and repressed by TR binding in the absence of TH [26].

2.2. The dual function model

By activating or repressing transcription in a TH dependent manner, TR has dual functions. Considering the importance of TR function in *X. laevis* development, this model has provided a good system to examine the dual function of TR in vivo. Moreover, the relatively rapid and developmentally critical transition from low to high TH levels at the onset of metamorphosis makes *Xenopus* a unique and important model to study the dual functions of the receptor in vivo. In *Xenopus*, the duplicated TR α and TR β genes are differentially regulated during development (Fig. 1; green and dark blue lines, respectively) [29,30]. TR β genes were found to be direct response genes (Fig. 1) [31,32,20]. Furthermore, TR and RXR genes are coordinately regulated in different tissues during amphibian development [25,20]. The tissue distribution has shown a correlation between TR/RXR expression and organ transformation during metamorphosis [33,30,34]. While TR (such as TR α) is present during both larval and metamorphic periods, TR β is present only during metamorphosis. Thus, according to the dual function model, TR functions in these two phases are distinct. First, during the larval period, unliganded TR should repress TH response genes (Fig. 1). Second, during the metamorphic period, liganded TR should activate TH target genes

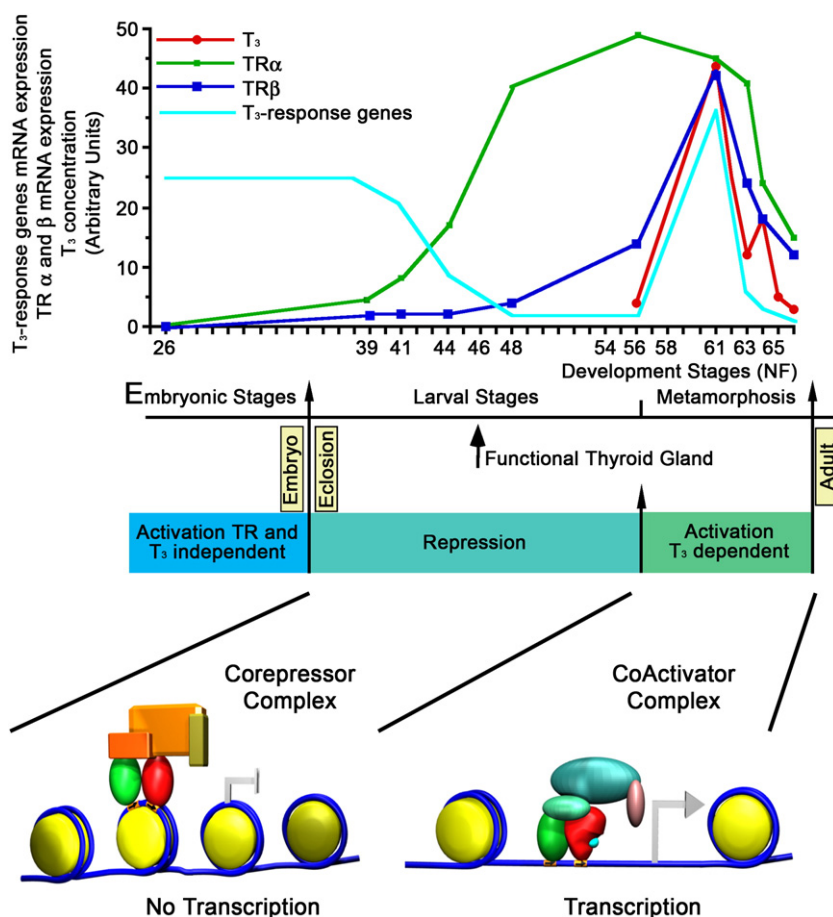


Fig. 1. TR dual function during tadpole development. During embryonic stages of *Xenopus laevis* development, T_3 concentration and the levels of both TR α and β isoforms are low (respectively red, green and blue lines) and those genes characterized as being T_3 responsive at later stages are expressed in a T_3 independent manner (cyan line). After hatching, TR α expression increases progressively, together with the maturation of the thyroid gland, although at these early stages, T_3 concentration remains low. This leads the TR/RXR heterodimers (red/green) bound to TREs (arrows) to recruit the corepressor complex and block T_3 response gene expression, thus preventing premature metamorphosis (lower panel left). During metamorphosis, high T_3 concentrations are associated with strong expression of TR β . The presence of both TH and TR results in the release of the corepressor complex (orange/yellow) and recruitment of the coactivator complex (light-blue/pink) at TREs (arrows), thus driving T_3 response gene expression (lower panel right). DNA: blue line around, histones octamer: yellow cylinder. Stages of development are indicated according to the table of *Xenopus laevis* development [27]. Plasma T_3 concentrations are from Leloup and Buscaglia [28]. mRNA levels for TR α and TR β are based on data from Yaoita and Brown [29]. TH response gene mRNA level is indicated in accordance with sonic hedgehog expression [45] and stromelysin 3 expression [46].

(Fig. 1) [35,36]. According to this dual function model, during embryogenesis, some TH inducible genes are expressed at a basal level for their role in embryonic organogenesis (Fig. 1; cyan line). In premetamorphic tadpoles, TRs, mostly TR α (Fig. 1; green line), act to repress TH response genes (Fig. 1; cyan line). As many of these genes are likely to participate in metamorphosis, their repression by unliganded TR helps to prevent premature metamorphosis and ensure a proper period of tadpole growth. At the onset of metamorphosis, stimulation of the thyroid gland leads to increased synthesis and secretion of TH into circulation (Fig. 1; red line representing T_3 level). As resultant intracellular TH concentrations increase, T_3 binds and transforms TRs from repressors to activators, which will induce the expression of TH response genes, thus leading to metamorphosis.

Studies in the last two decades have provided several pieces of evidence to support this model. First, many genes have been identified as TH response genes during amphibian metamorphosis [37–44,21]. As previously indicated, some of them are expressed during embryogenesis (Fig. 1; cyan line). Their mRNA levels are subsequently down-regulated at the beginning of larval stages that coincides with the increase of TR α mRNA levels in the absence of TH and up-regulated again during metamorphosis when T_3 is present (Fig. 1; cyan line) [45,46]. Second, TR and RXR are bound to TREs of TH response genes even at larval stages in the absence of T_3 [35,47]. Third, overexpression of TR and RXR in embryos prior to tadpole stages leads to the

precocious repression of endogenous TH target genes and the addition of TH can activate these genes in the embryos [24].

More recent molecular and genetic studies provided direct evidence that TR is sufficient for mediating the metamorphic effects of T_3 . Transgenic expression of a dominant positive TR (dpTR) that cannot bind to TH but functions as a constitutive activator of TH target genes leads to precocious gene activation and metamorphic transformations just like TH treatment (Fig. 2) [48]. Furthermore, transgenic expression of dominant negative TR (dnTR), which can not bind T_3 , blocked TH induced activation of TH target genes and morphological changes (Fig. 2) [49–51]. The correlation between dpTR mediated gene activation and induction of metamorphosis and the dnTR mediated gene repression and inhibition of metamorphosis supports clearly indicates that the metamorphic role of TH is through TR via genomic action of the hormone and not the non genomic action as observed in other cellular and animal contexts [52–54]. Thus, TR is necessary for both preventing premature and at the appropriate time inducing amphibian metamorphosis, supporting the dual function model of TR in development.

3. Coregulator requirement

Direct interactions of TR and RXR with transcriptional machinery were first proposed to explain the mechanism of receptor action.

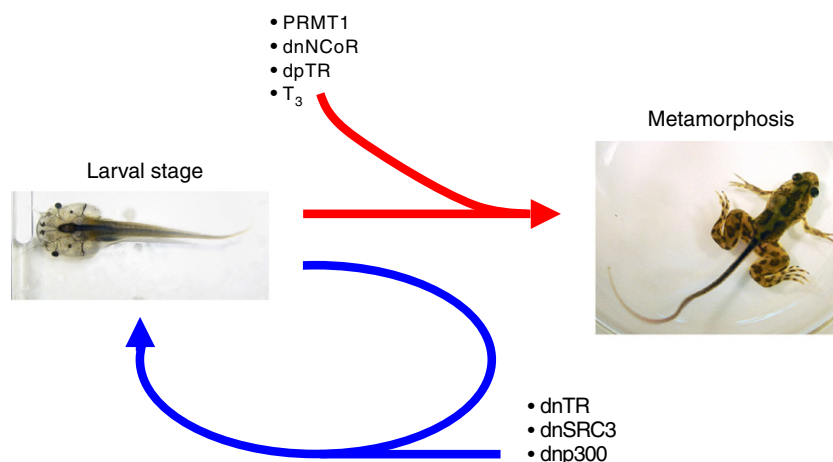


Fig. 2. Various mechanisms that can accelerate or inhibit metamorphosis. Exogenous TH (T_3) can trigger metamorphosis, which can be accelerated in animals overexpressing protein arginine methyltransferase (PRMT1), dominant positive mutants of TRs (dpTR), or dominant negative mutants of NCoR (dnNCoR). This is the result of the derepression and/or activation of TH response genes. Conversely, metamorphosis can be inhibited by overexpression of dominant negative mutants of SRC3 (dnSRC3), p300 (dnp300) or TR (dnTR), leading to the inhibition of TH responsive gene expression.

However, the discovery that proteins could function as corepressors and coactivators implied that instead of signaling to the transcriptional machinery directly, TR might affect gene expression *in vivo* during development through the recruitment of different cofactors.

3.1. Corepressors

Several corepressor complexes composed of proteins recruited by *Xenopus* TR in the absence of ligand have been characterized [55–57]. Proteins such as NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) and SMRT (Silencing Mediator for RAR and TR) have emerged as important players for unliganded TR mediated gene repression [58]. Both are large proteins (270 kDa) with very similar domain architecture. In the COOH terminal portion, they possess the domain for interaction with TR and other nuclear receptors. This domain contains three LXXI/VI motifs (CoRNR boxes) that play a major role in binding with domains D and E of TR [59–62]. In the NH₂ terminal portion, four domains are involved in the transcriptional repression [63–65].

Analyses of TH response gene expression indicate that they are repressed in tadpoles prior to metamorphosis. Our dual function model suggests that this repression is active and TR dependent. Consistently, TR has been shown to bind to TH response gene promoters containing TREs during premetamorphosis as well as metamorphosis [35]. Several lines of evidence have shown that corepressors are recruited at the TREs of TH response genes in the absence of T_3 . First, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays have demonstrated the association of NCoR with the TRE of TH response genes in premetamorphic tadpoles [58]. Second, by using *in vivo* gene transfer in premetamorphic tadpole tail muscle, a dominant negative NCoR was overexpressed. This dominant negative form corresponds to a peptide containing only a CoRNR box of NCoR nuclear receptor binding domain, which could bind to TR to prevent endogenous wild type NCoR from interacting with TR. Overexpression of the peptide led to the loss of repression by unliganded TR and therefore, increased transcription of a TH dependent promoter cotransfected into premetamorphic tadpole tail muscle [58]. Third, transgenic overexpression of a different dominant negative form of TR binding corepressor NCoR (dnNCoR) consisting of its full receptor interacting domain, which could compete away the binding of endogenous NCoR to unliganded TR, led to significant derepression of TH response genes and faster tadpole development than in wild type siblings (Fig. 2) [66].

Several studies have led to the biochemical purification and characterization of NCoR and SMRT complexes associated with histone deacetylase HDAC3, TBL1 (transducin beta like protein 1) and TBL1R

(TBL1 related protein) [56,57,67]. Cell culture studies strongly suggest a unique role of NCoR/HDAC3 in repression by unliganded TR in *X. laevis* [68] and in mammals [69]. HDAC3 is a histone deacetylase linking TR mediated gene repression and chromatin structure (see below). In mammals, TBL1 and TBL1R are proteins involved in protein complex recruitment and release with a link to proteasome degradation [70]. Other NCoR complexes have been characterized [55]. One of them is characterized by the presence of HDAC1 instead of HDAC3. In specific contexts (gene or tissue), it is possible that such a HDAC1/NCoR complex could contribute to TR repression as suggested by studies in *X. laevis* [35,47]. First, the association of HDAC1 with the TREs of TH response genes was observed in premetamorphic tadpoles. The release of HDAC1 following T_3 treatment was TH response gene specific [47]. An observation that was also confirmed using a reconstituted transcription system in frog oocyte [68]. For some genes, HDAC1 is released to activate transcription, but for other HDAC1 recruitment is maintained even in the presence of the hormone and high levels of transcription [47]. Recently, this last observation was confirmed at the whole genome level in mammals showing the presence of both histone acetyl transferase and HDAC activity at activated genes [71].

3.2. Coactivators

A larger number of coactivators have been identified to bind TR and transduce transcriptional activation signals in the presence of T_3 . Like corepressors, coactivators, such as steroid receptor coactivator (SRC/p160) and p300, form multi-protein complexes [72]. Among them are the three members of the SRC subfamily. One of them, SRC3 was cloned in *X. laevis* and was found to be dramatically upregulated during natural and T_3 induced metamorphosis [73]. SRC3 was recruited in a gene and tissue dependent manner to target genes by TR, both upon T_3 treatment of premetamorphic tadpoles and during natural metamorphosis. At one target gene, SRC3 behaved as described in the current model for TR mechanism of action: recruitment only in the presence of TH [47,74,75]. On another TRE, SRC3 was not recruited in a TH dependent manner in tadpoles, suggesting either no recruitment or constitutive association [47,74]. Interestingly, at the same TRE, SRC3 was recruited only in the presence of T_3 when analyzed in a reporter assay in the frog oocyte [76]. It is possible that cell type specificity or the assay system contributes to this difference. The possible constitutive presence of SRC3 on a TRE but the release of NCoR following T_3 treatment suggests that NCoR is a crucial component of the regulation pathway. This may involve the inhibition of HAT

(histone acetyltransferase) activity, a process that was described in mammals for SMRT complex [77]. Finally, transgenic overexpression of a dominant negative SRC3 [75], whose recruitment in a TH dependent manner blocks the recruitment of endogenous coactivators thereby preventing the TH dependent gene regulation, caused the inhibition of essentially all aspects of TH induced metamorphosis, as well as natural metamorphosis, leading to delayed or arrested metamorphosis (Fig. 2). Interestingly, the release of corepressors was not affected, demonstrating that coactivator recruitment, aside from corepressor release, is required for a TH function in development. All these results suggest that SRC3 is utilized in a gene and tissue specific manner by TR during development. It would be of considerable interest in the future to determine whether and how the promoter context and/or cofactor compositions in different tissues dictate the use of cofactors in gene regulation by TR in vivo.

Next, to determine whether SRC/p300 complex was indeed required, the in vivo role of the histone acetyltransferase p300/CREB binding protein (CBP) was also analyzed. ChIP assay revealed that p300 is recruited to TH responsive enhancers with a pattern similar to the one observed for SRC3. Furthermore, transgenic tadpoles overexpressing a dominant negative form of p300 (dnp300), containing only the SRC interacting domain, displayed arrested or delayed metamorphosis (Fig. 2) [78]. The molecular analyses of these animals showed the recruitment of the p300 mutant by TR, displacing endogenous p300 and leading to inhibition of TH responsive gene expression. These results thus suggest that p300 and/or its related CBP is an essential component of the TR signaling pathway in vivo. They also support the notion that p300/CBP and SRC3 proteins are part of the same complex regulating metamorphosis.

The SRC3/p300 coactivator complex is also composed of other proteins, including the coactivator associated arginine methyltransferase 1 (CARM1), which methylates arginine at positions 2, 17 and 26 of histone H3. *X. laevis* CARM1 was cloned and two alternative splicing forms, CARM1a and CARM1b, were obtained [79]. Both isoforms are expressed throughout metamorphosis. However, CARM1b had little effect on TR mediated transcription, whereas CARM1a enhanced gene activation by liganded TR. ChIP assays showed that both isoforms were recruited to the promoter by liganded TR. However, the binding of liganded TR to DNA was reduced with CARM1b, leading to a slight reduction in histone methylation at the TRE locus. These results suggest that CARM1 may play a role in the TR-mediated transcriptional regulation during metamorphosis and that its function is regulated by alternative splicing [79].

CARM1 is not the only arginine methyltransferase in the SRC3/p300 complex. Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) acts as a transcription coactivator for nuclear receptors through histone H4 R3 methylation. The involvement of PRMT1 in TR function during amphibian development has also been analyzed [80]. PRMT1 expression was upregulated during metamorphosis. PRMT1 was recruited to TREs of endogenous target genes and enhanced TR binding to DNA. The ChIP data showing more TR binding in the presence of PRMT1 was most likely due to a more stable complex of TR with DNA and with coactivators (more coactivator would drive more complex formation), and not that liganded TR has more affinity of DNA. Another possibility could be that TR was more efficiently crosslinked to the DNA in the presence of PRMT1. The fact that PRMT1 also enhanced transcription would support the first explanation. PRMT1 recruitment thus led to transcriptional activation by liganded TR. Transgenic animals overexpressing PRMT1 showed an increase of TH target gene activation in vivo and accelerated natural and TH induced metamorphosis (Fig. 2). Surprisingly, PRMT1 was only transiently recruited to the TRE during metamorphosis. These results thus indicate that PRMT1 action as a coactivator in TR mediated transcription was transient to enhance TR binding to TRE and target gene activation [80]. These results further suggest that PRMT1 has tissue-specific roles in regulating the rate of metamorphosis.

Two other categories of multi protein coactivator complexes that also mediate TR activation of transcription in amphibians have been identified [76]. These are the mediator complexes such as vitamin D receptor interacting protein (DRIP), TR associated protein (TRAP), and activator recruited cofactor (ARC) complexes and chromatin remodeling complexes such as SWI/SNF. However, their role and function during development in vivo remains to be elucidated. Only two coactivators participating in such complexes were analyzed in the context of metamorphosis [81]. In this study, the expression of Brahma related gene 1 (BRG1), a chromatin remodeling enzyme, was found to be increased by T₃ at metamorphic climax in *X. laevis*, whereas BRG1 associated factor 57 (BAF57), a BRG1 binding protein member of the BRG1 containing chromatin remodeling complexes, was found to be expressed constantly during development. BRG1 and BAF57 are recruited by liganded TR to enhance the transcriptional activation. The effect relies on chromatin remodeling because a remodeling-defective BRG1 mutant inhibited the activation.

Thus multiple cofactor complexes have been identified which contribute to the transcriptional activation regulated by amphibian TRs. While they may have different and multiple roles in regulating transcription, one of their main actions is likely through chromatin modification.

4. Chromatin remodeling during gene regulation by TR

Wrapping DNA around the core histones in a nucleosome, the basic building block of chromatin, creates severe steric impediments for transcription factors that need to gain access to specific recognition sequences [82]. Chromatin is a dynamic structure that can be reorganized by corepressors or coactivators, thereby altering access of transcriptional machinery to the DNA. In addition to histones, genomic DNA in eukaryotic cells is also associated with other nuclear proteins, including transcription factors and cofactors. Transcriptionally active DNA has a protein composition different from transcriptionally silent DNA. There are two general types of chromatin reorganization/remodeling that can be distinguished: histone modifications [83,84] and chromatin structure alterations [85,86]. Both may affect DNA accessibility. Histone modifications are mostly post-translational modifications of the histone NH₂ terminal tail. At least 130 histone modifications have been reported [87], including acetylation, phosphorylation, methylation, propionylation, nutyrylation, formylation, ubiquitylation, sumoylation, citrullination, proline isomerization, ADP ribosylation, tyrosine hydroxylation and crotonylation. Chromatin structure alterations may involve changes in nucleosome structure, histone composition, and nucleosome removal [88,89]. Chromatin can have multiple roles in the regulation of TH target gene expression in vivo.

4.1. Chromatin structure alteration

Several studies have provided strong evidence that liganded TR induces extensive chromatin remodeling in vivo. First, analysis in the reconstituted frog oocyte system in vivo suggests that TR/RXR heterodimer is able to recognize a TRE within chromatin. This is probably because TR/RXR can bind to a TRE in vivo in the absence of TH. In addition, in the reconstituted frog oocyte system, where one can study gene regulation by TR in the context of chromatin, TR makes use of chromatin assembly processes to silence transcription efficiently and TR directs the disruption of local chromatin structure in response to TH [26,90–93]. These studies have correlated hormone-dependent transcriptional activation with chromatin remodeling (Fig. 3), often revealed by loss of canonical nucleosomal ladder, formation of DNase I hypersensitive sites, increased nuclease accessibility or changes in DNA topology. The disruption corresponds to a change that is equivalent to the loss of a few nucleosomes (2 to 3) per TR/RXR binding [90,91], a phenomenon that has also recently been

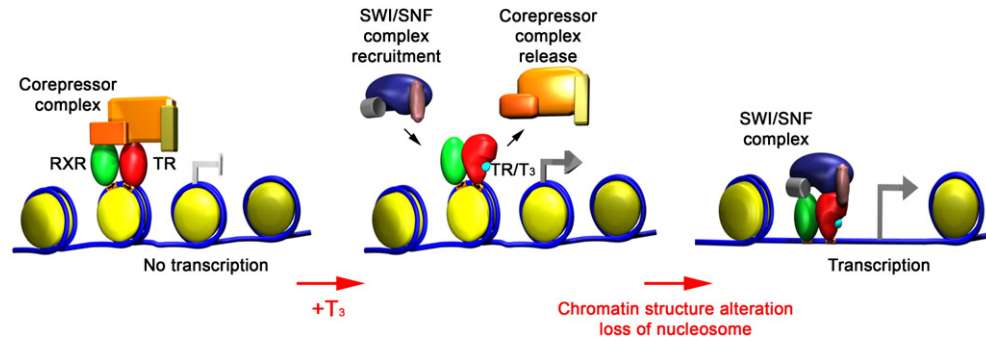


Fig. 3. Transcriptional regulation by TR through chromatin remodeling. In the absence of TH (left panel), the TR/RXR heterodimer binds to TREs (arrows on blue line representing the DNA around the histone octamers which appear as yellow cylinders). Then, the unliganded TR recruits the corepressor complex, which in turn causes chromatin to switch to a non-permissive state for transcription. This remodeling is dependent of HDACs and certain HMT activities and results in target genes silencing. Upon T_3 binding to TR (middle panel), conformational changes drive the release of the corepressor complex and the recruitment of the chromatin remodeling complex SWI/SNF. Such coactivator activities result in chromatin structure alteration and nucleosome loss (right panel), which causes chromatin to switch to a state permissive for transcription.

observed during metamorphosis. TH induces nucleosome removal on the endogenous TH response genes in the intestine of *X. tropicalis* tadpoles [94]. This was determined on endogenous TR target genes by carrying out ChIP assays with antibodies against the total H2B and H3 of the core histones on intestine isolated from premetamorphic tadpoles. Upon T_3 treatment of premetamorphic tadpoles, the amount of histones H2B and H3 was drastically reduced at the TRE regions of TH response genes. Conversely, a few changes were observed where there were no TRE sites, indicating specific nucleosome removal associated with gene activation by liganded TR during intestinal remodeling. This is likely the manifestation of the chromatin disruption observed in the frog oocyte transcription system.

The mechanism of this nucleosome loss remains to be determined. Given the presence of multiple chromatin remodeling factors, it has been difficult to pinpoint the specific effect and function of a single factor. However, studies suggest that this remodeling may be caused by the recruitment of BRG1 (SWI/SNF) chromatin remodeling complexes by liganded TR to the minichromosome in oocyte [76,81] as well as the recruitment of BAF57 [81]. SWI/SNF can alter chromatin structure by inducing changes in conformation and/or position (sliding), DNA topology or even the loss of histones/nucleosomes, which are likely required for exposing important regulatory DNA sequences to transcription factors and especially basal transcription machinery. Both BRG1 and BAF57 are expressed during intestinal metamorphosis in *X. laevis* [81]. It is very likely that liganded TR bound to the TREs of TH response genes in the tadpoles recruits BRG1 and BAF57 containing chromatin remodeling complexes to remove the nucleosomes at the target genes (Fig. 3).

Although previous studies suggest that nuclear receptors may recruit the SWI/SNF directly, SWI/SNF is unlikely to be recruited through a direct interaction with liganded TR. In oocytes, the recruitment of SWI/SNF is likely to be initiated through a direct or indirect interaction with CBP/p300, which in turn can modify histones (see below) to subsequently provide additional anchors that further stabilize the recruitment of SWI/SNF [76].

4.2. Histone modifications: acetylation

Many histone modifications are involved in the control of transcriptional regulation [95,96]. Some of them have been studied during metamorphosis (Fig. 4). First, acetylation allows neutralization of positive charges abundant in histone tails and reduces the affinity of the NH_2 terminal tails for negatively charged DNA. This change affects nucleosome conformation, enabling a more open chromatin that is more accessible to transcriptional machinery and favors the recruitment of other coactivators such as complexes containing SWI/SNF and mediator [76]. Histones H3 and H4 are deacetylated around the genomic loci containing a TRE in the absence of TH in tadpoles before

metamorphosis. T_3 treatment increased histone H4 acetylation in vivo [35]. The levels of histone H3 and H4 acetylation were correlated with the levels of gene expression, TR binding and RNA polymerase II recruitment [97,94]. Treatment with trichostatin A (TSA), a HDAC inhibitor [98] caused an increase of histone H4 acetylation at TH response gene TREs and increased transcription [35,99,100], further supporting a role for histone acetylation in gene regulation by TR.

Five lysines can be acetylated in the NH_2 terminal tail of histone H4. It has been shown that lysine 5 (H4K5) of H4 is the preferred target of HDAC3, although all lysines can be targeted by HDAC3 [101]. Consistently, T_3 treatment increased acetylation mainly at H4K5 [LM Sachs, unpublished data], likely due to the release of NCoR/HDAC3 or SMRT/HDAC3 corepressor complexes. Histone H3 also has five lysines that can be acetylated. High levels of AcH3K9 were detected in the absence of TH. The absence of any effect by TH on AcH3K9 correlates with the absence of SRC3 acetylation activity when recruited by

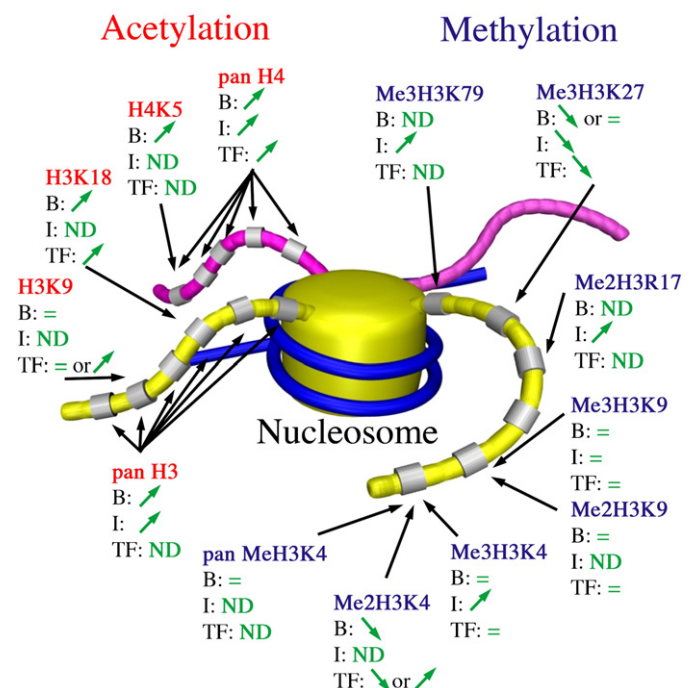


Fig. 4. Post-translational modifications of histone tails induced by T_3 during metamorphosis. During tadpole development, acetylation or methylation of the histone tail residues is both stage and tissue specific. Affected residues are mainly lysine (K) or arginine (R). Brain (B), Intestine (I) and Tail-fin (TF). Up arrows (↑), down arrows (↓), equal signs (=) and ND respectively correspond to an increase of, a decrease of, no change in, or no data available for the presence of the indicated mark in the specified context.

liganded TR. SRC3 is supposed to incorporate this mark. However, some data indicate that when SRC3 is recruited by a nuclear receptor, H3K9 acetylation activity is not required. Moreover, as AcH3K9 level is already high, recruitment of additional HAT may not matter. It has been shown that T_3 treatment increased lysine 18 (H3K18) acetylation [97]. This may be due to the recruitment of the acetylase p300, which can acetylate H4K5 and H3K18 [76]. Furthermore, it is generally believed that histone acetylation likely affects nucleosomal higher order chromatin structure, alters histone tail/DNA interaction and/or serves as a “code” for regulatory proteins (such as SWI/SNF) and basal transcriptional machinery docking. The histone acetylation exerted by CBP/p300 subsequently provides additional anchors to further stabilize the recruitment of SWI/SNF [76].

TR mutant overexpression and coregulators mutant analysis studies also highlight the importance of acetylation in gene regulation. The binding of dpTR to known TH target genes increased local histone acetylation and gene activation, similar to liganded TR during natural metamorphosis [48]. Alternatively, the transgenic overexpression of dnTR, which binds endogenous target promoters to repress their expression, led to retention of corepressors and continued histone deacetylation in the presence of TH. Likewise, transgenic overexpression of a dominant negative SRC3 [75], whose recruitment is TH dependent, blocks the recruitment of endogenous coactivators and histone acetylation and thereby preventing the TH dependent gene activation.

4.3. Histone modifications: methylation

Methylation represents a more complex type of modification that targets principally H3. Four arginine residues (R2, R8, R17 and R26) and six major lysine residues (K4, K9, K27, K36, K79 and K20) can each be mono, di or trimethylated. The position and the degree of methylation can have different transcriptional consequences, unlike histone lysine acetylation, which is generally associated with activation [102]. To determine whether these modifications play a role in gene regulation by TR during development, ChIP assays were carried out with antibodies against different histone modifications in several tissues (brain, intestine and/or tail fin) in premetamorphic tadpole and during TH induced or natural metamorphosis (Fig. 4).

First, H3 lysine 9 (H3K9) dimethylation and trimethylation, which are associated with closed chromatin and gene repression [103], were shown not to be involved in TR mediated T_3 gene regulation [97,94]. The other repressive mark [104], the trimethylation of histone H3 at lysine 27 (Me3H3K27), was tissue specific and, as expected inversely correlated with the basal level of TH response gene expression measured in the absence of TH. Then, T_3 treatment decreased the level of Me3H3K27 in proportion to the initial level of occupancy and initiated the transcriptional induction of T_3 target genes [97,94]. Thus, of the two repressive histone marks found in mammalian cells, only one, Me3H3K27, was correlated with gene regulation by TR during metamorphosis. Moreover, the histone methyltransferase (HMT) involved in Me3H3K27 acquisition is the protein enhancer of zeste 2 (ezh2), a core component of the Polycomb repressive complex 2 [105]. Utx and JMJD3 are the histone demethylases involved in removing the Me3H3K27 mark [106]. These results point to a novel role of Polycomb and Thrithorax for regulating TH response genes. Thus, a tissue specific recruitment of Polycomb complexes in the absence of T_3 may result in methylation of H3K27 and stronger gene repression. TH induced gene activation may involve the recruitment of Trithorax complexes to remove H3K27 methyl marks.

Next, H3 lysine 79 trimethylation (Me3H3K79) and H3 arginine 17 asymmetrically dimethylated (Me2H3R17), two histone marks that have clearly been associated with activation of gene transcription, were also analyzed on intestine isolated from premetamorphic tadpoles. The results showed that the levels of all these activation marks were increased upon T_3 treatment at the TRE regions [94],

suggesting that the recruitment of DOT1 methylates H3K79 [107] and that CARM1 is recruited for arginine methylation [108,109]. However, no evidence has been found that DOT1 is in a coactivator complex recruited by TR. As previously indicated, CARM1 is part of such a coactivator complex [79]. Thus, these histone marks are associated with high levels of gene expression in mammalian cells and utilized by TR for transcriptional activation of target genes in amphibians.

Finally, H3 methylation at lysine 4 (MeH3K4), which can correlate with either activation or repression [96], has TH dependent gene and tissue specific variations in premetamorphic tadpoles following T_3 treatment. T_3 decreased levels of dimethyl H3K4 (Me2H3K4) on one of the TRE locus and increased it on another TR binding site [97]. Similarly, depending on the TRE analyzed, trimethyl H3K4 (Me3H3K4) was clearly present with no effect of T_3 , increased following T_3 treatment or was absent to low level depending the tissues analyzed [97,94]. The results showed that at the TRE regions of TH activated genes, the levels of global H3K4 methylation (Me2 and Me3) were increased upon T_3 treatment. This is in agreement with the correlation between these marks and gene activation observed in mammals. To further address the role of H3K4 methylation, the effect of a HDM inhibitor involved in the deposition of this mark was investigated [97]. Pargylin is a monoamine oxidase inhibitor that blocks LSD1 [110], the first HDM described [111]. LSD1 was shown to demethylate mono and dimethyl H3K4. Pargylin treatment increased TH response gene expression and H4 acetylation indicating that HDM requirement is part of the TR regulation processes. The increase in AcH4 strongly emphasizes the functional interplay between demethylation and deacetylation. Furthermore, H3K4 methylation levels correlated interestingly, with TR binding to TRE [97]. Again, making use of Pargylin, the HDM inhibitor increased H3K4 methylation at the TRE region and significantly increased TR binding to DNA at the same locus. The present data thus demonstrates a strong link between H3K4 methylation and TR binding. This observation is in accordance with the proposed function of H3K4 methylation mark and the observations from whole genome mapping of H3K4 methylation, which showed strong association with enhancer or promoter regions [112,113].

Interestingly, even though Me3H3K27 and Me3H3K4 are considered to have opposing effects on gene activity, these studies suggested Me3H3K27 and Me3H3K4 are simultaneously recruited to the same TRE regions [114]. They could be concomitant on a certain DNA locus with the repression function of Me3H3K27 having a dominating effect. Most of these bivalent genes are either poised for transcription, with preinitiated RNA Polymerase II at their promoter [115] or transcribed at a low level [116]. Such a bivalent situation has also been observed for TH response genes [97] but clear demonstration has not been obtained yet. It is possible that the Me3H3K27 and Me3H3K4 do not occur at the same site. However, cobinding of HDAC1 and p300 at the enhancer of the same silent locus was observed for many bivalent genes [116] and for some TREs [47].

5. Model of thyroid hormone receptor mechanism of action

Over a decade ago, a working model was proposed to explain the mechanism of repression by unliganded TR and activation of transcription by liganded TR on positively regulated genes [117]. It is still largely valid today but should be modified into a more complex model, reflecting the knowledge accumulated from amphibian studies. These studies demonstrated that TREs should be organized into two categories. The first one is linked to TREs that bind unliganded and liganded TR (Fig. 5A and B) as found on the *TRβ* gene locus, and the second one to TREs that only bind liganded TR, as identified on the *TH/bZIP* gene locus in tail fin (Fig. 5C and D) [97]. The TRE locus seems first to be devoid of H3K9 methylation marks which involve the action of H3K9 HDM or/and the inhibition of H3K9 HMT before and in concomitance with TR binding.

In the absence of T_3 , TR and RXR bind to TREs assembled in chromatin containing H3K4 methylation (compare Fig. 5A to C). High level of H3K4 methylation correlates with high level of TR binding to DNA while low level is associated with absent to weak binding. The deposition of H3K4 methylation requires the recruitment of Me2H3K4 and Me3H3K4 HMT. Conversely, the absence of H3K4 methylation requires the recruitment of Me2H3K4 and Me3H3K4 HDM. The heterodimer also recruits an NCoR/SMRT corepressor complex that contains at least HDAC activity (Fig. 5A and C). Data strongly suggest a unique role of NCoR/HDAC3 in repression by unliganded TR. However, it is possible that HDAC1 contributes to TR repression in other cell types or other genes as shown in *X. laevis*. Histone deacetylation leads to a closed chromatin conformation, inaccessible for

transcriptional machinery. The repressed TH response gene is also associated with high level of Me3H3K27 that is deposited by ezh2 (Me3H3K27 HMT), the catalytic subunit of polycomb repressive complex. Other effects involving chromatin remodeling or direct interaction with transcriptional machinery could be involved. In mammals, some components of the SWI/SNF chromatin remodeling complexes were copurified with NCoR [118].

T_3 binding induces a conformational change of TR that relieves its inhibitory effect when already present on TRE loci (Fig. 5A toward 5B) and increases TR binding at TRE loci containing low levels of H3K4 (Fig. 5C toward D). Liganded TR will induce two changes: the release of the NCoR/HDAC3 corepressor complex followed by the recruitment of a coactivator complex such as SRC/p300 (Fig. 5C toward D). The HAT activity, specifically carried by p300 in this coactivator complex, leads to the acetylation of several histone H3 and H4 lysine residues (at least H4K5 and H3K18). Interestingly, for some TREs, HDAC1 is sequestered in a transcriptional activation context (Fig. 5B) while in other TREs it is released as expected (Fig. 5D). The gene specific function of such phenomenon is not understood but, as previously indicated in mammals, whole genome analysis of HAT and HDAC recruitment has led to the conclusion that both activities are required for gene activation [71]. Methyltransferases, such as CARM1 (H3R17) and PRMT1 (H4R3) are also recruited into the SRC/p300 complex (Fig. 5B and D).

The modification of histone methylation profiles is required for TH induced transcriptional activation. The H3K27 methylation first has to be removed because this repressive mark exerts a dominant effect on the other marks. This is made evident by the decreases in Me3H3K27 levels on the TRE locus upon treatment with T_3 , strongly suggesting the recruitment of Me3H3K27 HDM (Fig. 5B and D). Second, the H3K79 methylation level increases at the liganded TR bound to DNA loci. This mark, associated with gene activation, has to be deposited by a H3K79 HMT such as Dot1 (Fig. 5B and D). Third, a more complex H3K4 methylation pattern is observed that is gene and tissue specific. On the one hand, when the Me2H3K4 and Me3H3K4 levels were high in the absence of TH (Fig. 5A), the liganded TR led to the decrease of Me2H3K4 level and had no effect on Me3H3K4 level, which suggests the presence of Me2H3K4 HDM and Me3H3K4 HMT (Fig. 5B). On the other hand, when the Me2H3K4 and Me3H3K4 levels were low in the absence of TH (Fig. 5C), the liganded TR led to the increase of Me2H3K4 level and had no effect on Me3H3K4 level, which suggests the presence of Me2H3K4 HMT (Fig. 5D). However, in some tissues, an increase of Me3H3K4 level is measured suggesting also the recruitment of a Me3H3K4 HMT. The H3K4 residue is thus methylated in correlation with the transcriptional activity of the TH response gene.

All histone modifications lead to chromatin opening but other processes, such as nucleosome excision and transcriptional machinery recruitment, promote transcription activation. Upon T_3 treatment, TR can also interact with coactivator complexes such as the SWI/SNF complex involved in chromatin remodeling and the mediator complex directly involved in transcription activation. Although it seems unlikely that any single core promoter requires all the transcription complexes and different complexes are likely required for regulating distinct cis DNA elements in a temporal and tissue specific manner, it is also possible that these complexes have different functions and TR recruits all of them. If the latter is the case, the histone acetylation by SRC/p300 complex could be a prerequisite for the SWI/SNF and mediator complex recruitment and functions at specific TH response promoters [76]. Evidence therefore suggests that for TH dependent genes, TR coactivators can be recruited through a direct or indirect effect: TR/coactivator, coactivator/coactivator or coactivator/histone interaction. In such a dynamic process, liganded TR first interacts with the SRC/p300 complex. Then, p300 recruits SWI/SNF through direct or indirect interaction and its histone acetyltransferase

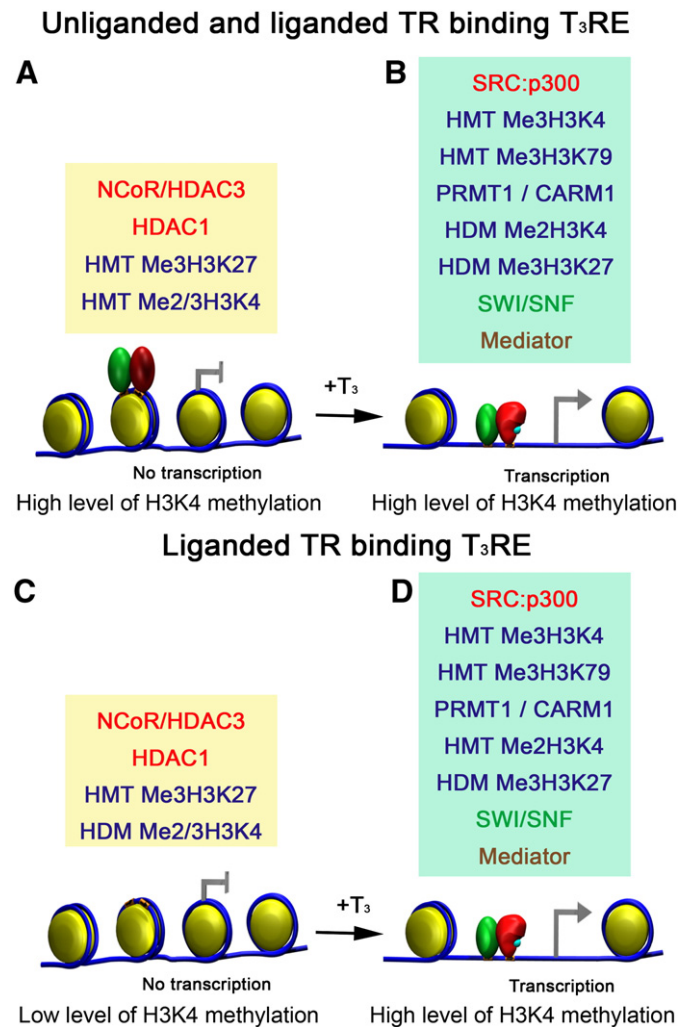


Fig. 5. Mechanisms of thyroid hormone receptor action in vivo. In the absence of ligand, direct response genes are silenced by two mechanisms, depending on the methylation state of the chromatin at TREs. First, TREs enriched in H3K4 methylation marks following the action of specific H3K4 HMTs can be bound by unliganded TR/RXR (upper left panel). In contrast, TREs not enriched in H3K4 methylation marks, a chromatin modification mark deposited by specific HDMs (HDM Me2/3 H3K4 such as Lsd1), are not bound by unliganded TR/RXR (lower left panel). However, regardless of the presence or absence of TR, NCoR appears to be present at these genes to keep the chromatin in a non-permissive state for transcription, mainly through the action of HDAC3. These genes are also associated with high levels of Me3H3K27, a chromatin modification mark deposited by Me3H3K27 HMT such as EZH2, and strongly associated with gene silencing. Upon T_3 binding to TR, conformational changes occur for TR/RXR both already bound to TREs (upper right panel) or free in the nucleus, enabling the latter to bind at TREs depleted in H3K4 methylation marks (lower right panel). Liganded TR recruits coactivator complexes, which induces transcription-permissive chromatin state. In particular, histone acetylation of lysine residues is likely to be carried out by p300 or related CBP, while both methylation and demethylation involve distinct HDMs and HMTs.

activity is required to further stabilize this interaction. Finally, the mediator complex is recruited through direct interaction with TR or indirectly through p300. Thus, the model proposed indicates that multiple cofactors carrying various histone modifications, chromatin structure modifying and transcriptional machinery recruitment activities are required for gene activation as well as gene repression.

6. Conclusions and perspectives

Anuran metamorphosis serves as an excellent model to understand the molecular mechanism of transcriptional regulation by TR in vivo during postembryonic development in vertebrates. Studies have provided strong evidence to show that TR has dual functions during development: first as an unliganded repressor of gene expression to ensure a proper tadpole growth period, and later, as a liganded activator to induce metamorphosis. These dual roles are exerted by recruiting corepressors and coactivators, respectively. While this basic dual function model is well supported, the complex details of the molecular pathways are just starting to be understood. Future work should focus on the regulation and effects of histone modifications, cofactor recruitment and dynamics of these histone modifications deposition and coregulator recruitment. Finally, metamorphosis also provides a wonderful system to address the tissue and gene specificity of TR action. High throughput technology will allow a better understanding of whole genome effects [119]. Furthermore, the genome is a complex regulatory landscape where genome topology is expected to cause variation in the transcriptome [120]. Three dimensional genome maps are required to understand all these regulatory networks.

Acknowledgements

This work was supported by the “Centre National de la Recherche Scientifique”, the “Muséum National d'Histoire Naturelle”, “CRESCENDO”, a European Integrated Project funding from FP6 (contract no. LSHM-CT-2005-018652), “IDEAL”, a European Large Integrated Project funding from FP7 (no. 259679) and “TRIGGER” (ANR-08-JCJC-0100-01), and the Intramural Research Program of the National Institute of Child Health and Human Development, NIH.

References

- [1] J.F. Gudernatsch, Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation: a contribution to the knowledge of organs with internal secretion, *Arch. Entwickl. Mech. Org.* 35 (1912) 457–483.
- [2] Y.-B. Shi, *Amphibian Metamorphosis. From Morphology to Molecular Biology*, first ed. John Wiley & Sons, New York, 1999.
- [3] V. Laudet, The origins and evolution of vertebrate metamorphosis, *Curr. Biol.* 21 (2011) R726–R737.
- [4] J.R. Tata, Gene expression during metamorphosis: an ideal model for post-embryonic development, *Bioessays* 15 (1993) 239–248.
- [5] A. Ishizuya-Oka, Y.-B. Shi, Evolutionary insights into postembryonic development of adult intestinal stem cells, *Cell Biosci* 1 (2011) 37.
- [6] Y.-B. Shi, T. Hasebe, L. Fu, K. Fujimoto, A. Ishizuya-Oka, The development of the adult intestinal stem cells: insights from studies on thyroid hormone dependent amphibian metamorphosis, *Cell Biosci.* 1 (2011) 30.
- [7] H. Gronemeyer, V. Laudet, Transcription factor 3: nuclear receptors, *Protein Profile* 2 (1995) 1173–1308.
- [8] M.M. Aagaard, R. Siersbæk, S. Mandrup, Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2011) 824–835.
- [9] G.M. Santos, L. Fairall, J.W.R. Schwabe, Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms, *Trends Endocrinol. Metab.* 22 (2011) 87–93.
- [10] J.R. Tata, Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin, *Nature* 197 (1963) 1167–1168.
- [11] J.R. Tata, Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of tadpole tail in organ culture, *Dev. Biol.* 13 (1966) 77–94.
- [12] J.H. Oppenheimer, D. Koerner, H.L. Schwartz, M.I. Surks, Specific nuclear binding sites in rat liver and kidney, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35 (1972) 330–333.
- [13] J. Sap, A. Munoz, K. Damm, Y. Goldberg, J. Ghysdael, A. Leutz, H. Beug, B. Vennström, The *c-erbA* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone, *Nature* 324 (1986) 635–640.
- [14] C. Weinberger, C.C. Thompson, E.S. Ong, R. Lebo, D.J. Gruol, R.M. Evans, The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor, *Nature* 324 (1986) 641–646.
- [15] A.R. Brooks, G. Sweeney, R.W. Old, Structure and functional expression of a cloned *Xenopus* thyroid hormone receptor, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 9395–9405.
- [16] Y. Yaoita, Y.-B. Shi, D.D. Brown, *Xenopus laevis* α and β thyroid hormone receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 7090–7095.
- [17] M.J. Schneider, V.A. Galton, Regulation of *c-erbA*-alpha messenger RNA species in tadpole erythrocytes by thyroid hormone, *Mol. Endocrinol.* 5 (1991) 201–208.
- [18] C. Helbing, G. Gergely, B.G. Atkinson, Sequential up-regulation of thyroid hormone beta receptor, ornithine transcarbamylase, and carbamyl phosphate synthetase mRNAs in the liver of *Rana catesbeiana* tadpoles during spontaneous and thyroid hormone-induced metamorphosis, *Dev. Genet.* 13 (1992) 289–301.
- [19] J.C. Davey, M.J. Schneider, V.A. Galton, Cloning of a thyroid hormone-responsive *Rana catesbeiana* *c-erbA*-beta gene, *Dev. Genet.* 15 (1994) 339–346.
- [20] X. Wang, H. Matsuda, Y.-B. Shi, Developmental regulation and function of thyroid hormone receptors and 9-cis retinoic acid receptors during *Xenopus tropicalis* metamorphosis, *Endocrinology* 149 (2008) 5610–5618.
- [21] B. Das, R.A. Heimeier, D.R. Buchholz, Y.-B. Shi, Identification of direct thyroid hormone response genes reveals the earliest gene regulation programs during frog metamorphosis, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 34167–34178.
- [22] B. Blumberg, D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, D.A. Bittner, R.M. Evans, E.M. De Robertis, Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell: families of retinoid “X” receptors and retinoic acid receptors in the *Xenopus* egg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 2321–2325.
- [23] S. Marklew, D.P. Smith, C.S. Mason, R.W. Old, Isolation of a novel RXR from *Xenopus* that most closely resembles mammalian RXR β and is expressed throughout early development, *Biochim. Biophys. Acta* 1218 (1994) 267–272.
- [24] M. Puzianowska-Kuznicka, S. Damjanovski, Y.-B. Shi, Both thyroid hormone and 9-cis retinoic acid receptors are required to efficiently mediate the effects of thyroid hormone on embryonic development and specific gene regulation in *Xenopus laevis*, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 4738–4749.
- [25] J. Wong, Y.-B. Shi, Coordinated regulation of and transcriptional activation by *Xenopus* thyroid hormone and retinoid X receptors, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18479–18483.
- [26] J. Wong, Y.-B. Shi, A.P. Wolffe, A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR β A gene by thyroid hormone receptor, *Genes Dev.* 9 (1995) 2696–2711.
- [27] P.D. Nieuwkoop, J. Faber, *Normal Table of Xenopus laevis* (Daudin), 2nd ed. North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1967.
- [28] J. Leloup, M. Buscaglia, La triiodothyronine: hormone de la métamorphose des amphibiens, *C. R. Acad. Sci. Paris* 284 (1977) 2261–2263.
- [29] Y. Yaoita, D.D. Brown, A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis, *Genes Dev.* 4 (1990) 1917–1924.
- [30] B.P. Eliceiri, D.D. Brown, Quantitation of endogenous thyroid hormone receptors α et β during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus laevis*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 24459–24465.
- [31] M. Ranjan, J. Wong, Y.-B. Shi, Transcriptional repression of *Xenopus* TR β gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 24699–24705.
- [32] I. Machuca, G. Esslemont, L. Fairclough, J.R. Tata, Analysis of structure and expression of the *Xenopus* thyroid hormone receptor- β gene to explain its autoinduction, *Mol. Endocrinol.* 9 (1995) 96–107.
- [33] A. Kawahara, B.S. Baker, J.R. Tata, Developmental and regional expression of thyroid hormone receptor genes during *Xenopus* metamorphosis, *Development* 112 (1991) 933–943.
- [34] L. Fairclough, J.R. Tata, An immunocytochemical analysis of the expression of thyroid hormone receptor α and β proteins during natural and thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus*, *Dev. Growth Differ.* 39 (1997) 273–283.
- [35] L.M. Sachs, Y.-B. Shi, Targeted chromatin binding and histone acetylation in vivo by thyroid hormone receptor during amphibian development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13138–13143.
- [36] L.M. Sachs, S. Damjanovski, P.L. Jones, Q. Li, T. Amano, S. Ueda, Y.-B. Shi, A. Ishizuya-Oka, Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development, comparative biochemistry and physiology, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126 (2000) 199–211.
- [37] Z. Wang, D.D. Brown, Gene expression screen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 11505–11509.
- [38] Z. Wang, D.D. Brown, Thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 16270–16278.
- [39] L. Buckbinder, D.D. Brown, Thyroid hormone-induced gene expression changes in the developing frog limb, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 25786–25791.
- [40] Y.-B. Shi, D.D. Brown, The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 20312–20317.
- [41] D.D. Brown, Z. Wang, J.D. Furlow, A. Kanamori, R.A. Schwartzman, B.F. Remo, A. Pinder, The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 1924–1929.
- [42] B. Das, L. Cai, M.G. Carter, Y.-L. Piao, A.A. Sharov, M.S.H. Ko, D.D. Brown, Gene expression changes at metamorphosis induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis* tadpoles, *Dev. Biol.* 291 (2006) 342–355.
- [43] D.R. Buchholz, R.A. Heimeier, B. Das, T. Washington, Y.-B. Shi, Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues, *Dev. Biol.* 303 (2007) 576–590.
- [44] L. Cai, B. Das, D.D. Brown, Changing a limb muscle growth program into a resorption program, *Dev. Biol.* 304 (2007) 260–271.

- [45] M.A. Stelow, Y.-B. Shi, *Xenopus* sonic hedgehog as a potential morphogen during embryogenesis and thyroid hormone-dependent metamorphosis, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 2555–2562.
- [46] D. Patterson, W. Pär Hayes, Y.-B. Shi, Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase gene *stromelysin-3* coincides with thyroid hormone-induced cell death during frog metamorphosis, *Dev. Biol.* 167 (1995) 252–262.
- [47] E. Havis, L.M. Sachs, B.A. Demeneix, Metamorphic T3-response genes have specific co-regulator requirements, *EMBO Rep.* 4 (2003) 883–888.
- [48] D.R. Buchholz, A. Tomita, L. Fu, B.D. Paul, Y.-B. Shi, Transgenic analysis reveals that thyroid hormone receptor is sufficient to mediate the thyroid hormone signal in frog metamorphosis, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 9026–9037.
- [49] D.R. Buchholz, S.-C.V. Hsia, L. Fu, Y.-B. Shi, A dominant-negative thyroid hormone receptor blocks amphibian metamorphosis by retaining corepressors at target genes, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 6750–6758.
- [50] A.M. Schreiber, B. Das, H. Huang, N. Marsh-Armstrong, D.D. Brown, Diverse developmental programs of *Xenopus laevis* metamorphosis are inhibited by a dominant negative thyroid hormone receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10739–10744.
- [51] A. Kanamori, D.D. Brown, The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 739–745.
- [52] J.J. Bergh, H.Y. Lin, L. Lansing, S.N. Mohamed, F.B. Davis, S. Mousa, P.J. Davis, Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis, *Endocrinology* 146 (2005) 2864–2871.
- [53] F.B. David, H.Y. Tang, A. Shih, T. Keating, L. Lansing, A. Hercbergs, R.A. Fenstermaker, A. Mousa, S.A. Mousa, P.J. Davis, H.Y. Lin, Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 7270–7275.
- [54] S.-Y. Cheng, J.L. Leonard, P.J. Davis, Molecular aspects of thyroid hormone actions, *Endocr. Rev.* 31 (2010) 139–170.
- [55] P.L. Jones, L.M. Sachs, N. Rouse, P.A. Wade, Y.-B. Shi, Multiple N-CoR complexes contain distinct histone deacetylases, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8807–8811.
- [56] J. Li, J. Wang, J. Wang, Z. Nawaz, J.M. Liu, J. Qin, J. Wong, Both corepressor proteins SMRT and C-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3, *EMBO J.* 19 (2000) 4342–4350.
- [57] F.D. Urnov, J. Yee, L.M. Sachs, T.N. Collingwood, A. Bauer, H. Beug, Y.-B. Shi, A.P. Wolffe, Targeting of N-CoR and histone deacetylase 3 by the oncoprotein v-ErbA yields a chromatin infrastructure-dependent transcriptional repression pathway, *EMBO J.* 19 (2000) 4074–4090.
- [58] L.M. Sachs, P.L. Jones, E. Havis, N. Rouse, B.A. Demeneix, L.M. Shi, Nuclear receptor corepressor recruitment by unliganded thyroid hormone receptor in gene repression during *Xenopus laevis* development, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 8527–8538.
- [59] I. Hu, M.A. Lazar, The CoNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors, *Nature* 402 (1999) 93–96.
- [60] L. Nagy, H.-Y. Kao, J.D. Love, C. Li, E. Banayo, J.T. Gooch, V. Krishna, K. Chatterjee, R.M. Evans, J.W.R. Schwabe, Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors, *Genes Dev.* 13 (1999) 3209–3216.
- [61] V. Perissi, L.M. Staszewski, E.M. McInerney, R. Kurokawa, A. Krones, D.W. Rose, M.H. Lambert, M.V. Milburn, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, Molecular determinants of nuclear receptor–corepressor interaction, *Genes Dev.* 13 (1999) 3198–3208.
- [62] P. Webb, C.M. Anderson, C. Valentine, P. Nguyen, A. Marimuthu, B.L. West, J.D. Baxter, P.J. Kushner, The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs), *Mol. Endocrinol.* 14 (2000) 1976–1985.
- [63] A.J. Hörlein, A.M. Näär, T. Heinzel, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Söderström, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor, *Nature* 377 (1995) 397–404.
- [64] L. Alland, R. Muhle, H. Hou, J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus, R.A. DePinho, Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression, *Nature* 387 (1997) 49–55.
- [65] T. Heinzel, R.M. Lavinsky, T.-M. Mullen, M. Söderström, C.D. Laherty, J. Torchia, W.-M. Yang, G. Brard, S.D. Ngo, J.R. Ravie, E. Seto, R.N. Eisenman, D.W. Rose, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature* 387 (1997) 43–48.
- [66] Y. Sato, D.R. Buchholz, B.D. Paul, Y.-B. Shi, A role of unliganded thyroid hormone receptor in postembryonic development in *Xenopus laevis*, *Mech. Dev.* 124 (2007) 476–488.
- [67] A. Tomita, D.R. Buchholz, Y.-B. Shi, Recruitment of N-CoR/SMRT–TBLR1 corepressor complex by unliganded thyroid hormone receptor for gene repression during frog development, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 3337–3346.
- [68] J. Li, Q. Lin, W. Wang, P. Wade, J. Wong, Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression, *Genes Dev.* 16 (2002) 687–692.
- [69] T. Ishizuka, M.A. Lazar, The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 5122–5131.
- [70] V. Perissi, A. Aggarwal, C.K. Glass, D.W. Rose, M.G. Rosenfeld, A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors, *Cell* 116 (2004) 511–526.
- [71] Z. Wang, C. Zang, K. Cui, D.E. Schones, A. Barski, W. Peng, K. Zhao, Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes, *Cell* 138 (2009) 1019–1031.
- [72] C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes Dev.* 14 (2000) 121–141.
- [73] B.D. Paul, Y.-B. Shi, Distinct expression profiles of transcriptional coactivators for thyroid hormone receptors during *Xenopus laevis* metamorphosis, *Cell Res.* 13 (2003) 459–464.
- [74] B.D. Paul, D.R. Buchholz, L. Fu, Y.-B. Shi, Tissue- and gene-specific recruitment of steroid receptor coactivator-3 by thyroid hormone receptor during development, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27165–27172.
- [75] B.D. Paul, L. Fu, D.R. Buchholz, Y.-B. Shi, Coactivator recruitment is essential for liganded thyroid hormone receptor to initiate amphibian metamorphosis, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 5712–5724.
- [76] Z.-Q. Huang, J. Li, L.M. Sachs, P.A. Cole, J. Wong, A role for cofactor–cofactor and –histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and mediator for transcription, *EMBO J.* 22 (2003) 2146–2155.
- [77] J. Yu, Y. Li, T. Ishizuka, M.G. Guenther, M.A. Lazar, A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation, *EMBO J.* 22 (2003) 3403–3410.
- [78] B.D. Paul, D.R. Buchholz, L. Fu, Y.-B. Shi, SRC-p300 coactivator complex is required for thyroid hormone-induced amphibian metamorphosis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 7472–7481.
- [79] H. Matsuda, B.D. Paul, C.Y. Choi, Y.-B. Shi, Contrasting effects of two alternative splicing forms of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 on thyroid hormone receptor-mediated transcription in *Xenopus laevis*, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1082–1094.
- [80] H. Matsuda, B.D. Paul, C.Y. Choi, T. Hasebe, Y.-B. Shi, Novel functions of protein arginine methyltransferase 1 in thyroid hormone receptor-mediated transcription and in the regulation of metamorphic rate in *Xenopus laevis*, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 745–757.
- [81] R.A. Heimeier, V.S. Hsia, Y.-B. Shi, Participation of Brahma-related gene 1 (BRG1)-associated factor 57 and BRG1-containing chromatin remodeling complexes in thyroid hormone-dependent gene activation during vertebrate development, *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 1065–1077.
- [82] B. van Steensel, Chromatin: constructing the big picture, *EMBO J.* 30 (2011) 1885–1895.
- [83] B.D. Strahl, D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature* 403 (2000) 41–45.
- [84] S. Henikoff, A. Shilatifard, Histone modification: cause or cog? *Trends Genet.* 27 (2011) 389–396.
- [85] A. Eberhart, P.B. Becker, ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 3707–3711.
- [86] D.C. Hargreaves, G.R. Crabtree, ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms, *Cell Res.* 221 (2011) 396–420.
- [87] M. Tan, H. Luo, S. Lee, F. Jin, J.S. Yang, E. Montellier, T. Buchou, Z. Cheng, S. Rousseaux, N. Rajagopal, Z. Lu, Z. Ye, Q. Zhu, J. Wysocka, Y. Ye, S. Khochbin, B. Ren, Y. Zhao, Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification, *Cell* 146 (2011) 1016–1028.
- [88] C.R. Clapier, B.R. Cairns, The biology of chromatin remodeling complexes, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 273–304.
- [89] V.K. Maier, M. Chioda, P.B. Becker, ATP-dependent chromatin remodeling, *Biol. Chem.* 389 (2008) 345–352.
- [90] J. Wong, Y.-B. Shi, A.P. Wolffe, Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation, *EMBO J.* 16 (1997) 3158–3171.
- [91] J. Wong, Q. Li, B.-Z. Levi, Y.-B. Shi, A.P. Wolffe, Structural and functional features of a specific nucleosome containing a recognition element for the thyroid hormone receptor, *EMBO J.* 16 (1997) 7130–7145.
- [92] J. Wong, D. Patterson, A. Imhof, D. Guschin, Y.-B. Shi, A. Wolffe, Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase, *EMBO J.* 17 (1998) 520–534.
- [93] Q. Li, A. Imhof, T.N. Collingwood, F.D. Urnov, P.A. Wolffe, p300 stimulates transcription instigated by ligand-bound thyroid hormone receptor at a step subsequent to chromatin disruption, *EMBO J.* 18 (1999) 5634–5652.
- [94] K. Matsuura, K. Fujimoto, L. Fu, Y.-B. Shi, Liganded thyroid hormone receptor induces nucleosome removal and histone modifications to activate transcription during larval intestinal cell death and adult stem cell development, *Endocrinology* 153 (2012) 961–972.
- [95] T. Kouzarides, Chromatin modifications and their function, *Cell* 128 (2007) 693–705.
- [96] A.J. Ruthenburg, C.D. Allis, J. Wysocka, Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark, *Mol. Cell* 25 (2007) 15–30.
- [97] P. Bilesimo, P. Jolivet, G. Alfama, N. Buisine, S. Le Mevel, E. Havis, B.A. Demeneix, L.M. Sachs, Specific histone lysine 4 methylation patterns define TR-binding capacity and differentiate direct T3 responses, *Mol. Endocrinol.* 25 (2011) 225–237.
- [98] M. Yoshida, M. Kijima, M. Akita, T. Beppu, Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17174–17179.
- [99] L.M. Sachs, T. Amano, N. Rouse, Y.-B. Shi, Requirement of histone deacetylase at two distinct steps in thyroid hormone receptor mediated gene regulation during amphibian development, *Dev. Dyn.* 222 (2001) 280–291.
- [100] L.M. Sachs, T. Amano, Y.-B. Shi, An essential role of histone deacetylases in postembryonic organ transformations in *Xenopus laevis*, *Int. J. Mol. Med.* 8 (2001) 595–601.
- [101] H.B. Hartman, J. Yu, T. Alenghat, T. Ishizuka, M.A. Lazar, The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3, *EMBO Rep.* 6 (2005) 445–451.
- [102] S.C. Wu, Y. Zhang, Role of protein methylation and demethylation in nuclear hormone signaling, *Mol. Endocrinol.* 23 (2009) 1323–1334.

- [103] C. Martin, Y. Zhang, The diverse functions of histone lysine methylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 838–849.
- [104] T. Swigut, J. Wysocka, H3K27 demethylases, at long last, *Cell* 131 (2007) 29–32.
- [105] R. Cao, L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, Y. Zhang, Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing, *Science* 298 (2002) 1039–1043.
- [106] P.A. Cloos, J. Christensen, K. Agger, K. Helin, Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease, *Genes Dev.* 22 (2008) 1115–1140.
- [107] A.T. Nguyen, Y. Zhang, The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation, *Genes Dev.* 25 (2011) 1345–1358.
- [108] Y.H. Lee, S.A. Coonrod, W.L. Kraus, M.A. Jelinek, M.R. Stallcup, Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 3611–3616.
- [109] M.T. Bedford, Arginine methylation at a glance, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 4243–4246.
- [110] E. Metzger, M. Wissmann, N. Yin, J.M. Müller, R. Schneider, A.H. Peters, T. Günther, R. Buettner, R. Schüle, LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription, *Nature* 437 (2005) 436–439.
- [111] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstone, P.A. Cole, R.A. Casero, Y. Shi, Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1, *Cell* 11 (2004) 941–953.
- [112] N.D. Heintzman, G.C. Hon, R.D. Hawkins, P. Kheradpour, A. Stark, L.F. Harp, Z. Ye, L.K. Lee, R.K. Stuart, C.W. Ching, K.A. Ching, J.E. Antosiewicz-Bourget, H. Liu, R.D. Green, V.V. Lobanenko, R. Stewart, J.A. Thomson, G.E. Crawford, M. Kellis, B. Ren, Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression, *Nature* 459 (2009) 108–112.
- [113] H.H. He, C.A. Meyer, H. Shin, S.T. Bailey, G. Wei, Q. Wang, Y. Zhang, K. Xu, M. Ni, M. Lupien, P. Mieczkowski, J.D. Lieb, K. Zhao, M. Borwn, X.S. Liu, Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers, *Nat. Genet.* 42 (2010) 343–348.
- [114] B.E. Bernstein, T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, E.S. Lander, A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells, *Cell* 152 (2006) 315–326.
- [115] M.G. Guenther, S.S. Levine, L.A. Boyer, R. Jaenisch, R.A. Young, A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells, *Cell* 130 (2007) 77–88.
- [116] J.K. Stock, S. Giadrossi, M. Casanova, E. Brookes, M. Vidal, H. Koseki, N. Brockdorff, A.G. Fisher, A. Pombo, Ring-1 mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 1428–1435.
- [117] A.P. Wollfe, Sinful repression, *Nature* 387 (1997) 16–17.
- [118] C. Uderhill, M.S. Qutob, S.P. Yee, J. Torchia, A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and corepressor KAP-1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40463–40470.
- [119] R.D. Hawkins, G.C. Hon, B. Ren, Next-generation genomics: an integrative approach, *nature reviews, Genetics* 11 (2010) 476–486.
- [120] E. Splinter, W. de Laat, The complex transcription regulatory landscape of our genome: control in three dimensions, *EMBO J.* 30 (2011) 4345–4355.

A- 2 Les technologies de séquençage à haut débit vont métamorphoser l'analyse de la fonction des récepteurs aux hormones thyroïdiennes pendant le développement de l'amphibien

Résumé

La métamorphose des amphibiens est marquée par des changements spectaculaires induits par les HTs (hormones thyroïdiennes), incluant de la morphogenèse, le remodelage de tissus et la résorption de tissus par mort cellulaire programmée.

Les HT agissent via leur récepteurs, les TRs (récepteurs aux HTs). En absence d'hormone, ceux-ci recrutent des complexes corépresseurs au niveau des gènes cibles. Ces complexes corépresseurs sont échangés pour des complexes coactivateurs en présence d'hormone. Afin de pleinement comprendre la diversité des effets de la T₃s (3,5,3'-triiodothyronines) durant la métamorphose, l'analyse du transcriptome et des mécanismes d'action de TR à l'échelle du génome est nécessaire.

Les nouvelles technologies de séquençage ont profondément changé la façon dont de nouvelles questions fondamentales sont abordées, et font maintenant partie des standards utilisés en génomique et en génomique fonctionnelle.

Cette revue se concentre sur les applications des nouvelles technologies de séquençage pour l'analyse et l'exploration de la métamorphose des amphibiens.

High-Throughput Sequencing Will Metamorphose the Analysis of Thyroid Hormone Receptor Function During Amphibian Development

Alexis G. Grimaldi^{*}, Nicolas Buisine^{*}, Patrice Bilesimo^{*1},
Laurent M. Sachs^{*2}

^{*}Laboratoire d'Évolution des Régulations Endocrinienne, Muséum National d'Histoire Naturelle,

Département Régulation, Développement et Diversité Moléculaire, UMR 7221 CNRS, Paris, France

¹Present address: Translational Research Center, Perleman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

²Corresponding author; e-mail address: sachs@mnhn.fr

Contents

1. Introduction	278
2. <i>Xenopus tropicalis</i> Genomic Sequence and Annotation: Current State	280
2.1 A fragmented genome assembly	280
2.2 An incomplete annotation	283
3. TH and TR Regulating Network Using NGS-Based Transcriptome Analysis	287
3.1 Toward a better annotation	287
3.2 NGS provides functional data to analyze TH-induced differential expression	291
4. TR interactome	292
4.1 Whole genome TR mapping	292
4.2 A need for 3D analysis	296
5. Conclusion	299
Acknowledgments	300
References	300

Abstract

Amphibian metamorphosis is marked by dramatic thyroid hormone (T₃)-induced changes including *de novo* morphogenesis, tissue remodeling, and organ resorption through programmed cell death. These changes involve cascades of gene regulation initiated by thyroid hormone (TH). TH functions by regulating gene expression through TH receptors (TR). TR are DNA-binding transcription factors that belong to the steroid hormone receptor superfamily. In the absence of ligand, TR can repress gene expression by recruiting a corepressor complex, whereas liganded TR recruits a coactivator

complex for gene activation. Earlier studies have led us to propose a dual function model for TR during development. In premetamorphic tadpoles, unliganded TR represses transcription involving corepressors. During metamorphosis, endogenous T₃ allows TR to activate gene expression. To fully understand the diversity of T₃ effects during metamorphosis, whole genome analysis of transcriptome and mechanism of TR action should be carried out. To this end, the new sequencing technologies have dramatically changed how fundamental questions in biology are being addressed and is now making the transition from technology development to being a standard for genomic and functional genomic analysis. This review focuses on the applications of high-throughput technologies to the field of amphibian metamorphosis.

1. INTRODUCTION

Amphibian development is marked by an indirect development. Embryonic development and juvenile life style are separated by a larval period (tadpole) that ends with metamorphosis. Metamorphosis is a switch that results in the reprogramming of the morphological and biochemical characteristics of nearly all tadpole organs (Shi, 1999). Transformations involve apoptosis of larval cells and concurrent proliferation and differentiation of adult cell types. Although complex, metamorphosis is directly initiated by thyroid hormone (TH) with 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) as the most biologically active agent. Interestingly, this hormone-controlled developmental phase shows strong similarities with the perinatal period in mammals, bird hatching, and of course other kind of metamorphosis such as in fish and insects (Laudet, 2011). Amphibian metamorphosis thus provides a powerful model to analyze the essential roles for TH, notably in maturation of the nervous system, the metabolism, the respiratory system, the intestine, and body shape modification (Shi, 1999; Tata, 1993).

TH acts through thyroid hormone receptor (TR) that belongs to the family of nuclear receptors (Gronemeyer & Laudet, 1995). TR is a transcription factor that regulates gene expression by binding to DNA at specific sites known as T₃ response elements (TREs), mostly composed of two direct repeats of the consensus sequence "AGGTCA" separated by four bases (DR4). TH is a versatile player. It can not only upregulate, but also down-regulate gene expression in target tissues or cells (Flamant, Gauthier, & Samartut, 2007). Moreover, in the absence of TH, TR can also repress or increase the transcription. As in mammals, there are two types of TR (α and β) in amphibian (Yaoita, Shi, & Brown, 1990). Their amino acid sequences are well conserved in evolution and amphibian TR behaves

similarly to the mammalian or avian TR. Unfortunately, there are only a very limited number of studies on gene repression by liganded TR (Santos, Fairall, & Schwabe, 2011). Thus, most discussions have been focused on the mechanism for T₃-response genes induced by T₃ (Grimaldi, Buisine, Miller, Shi, & Sachs, 2012). For these genes, in absence of hormone, TR binds T₃RE and recruits corepressor complexes carrying chromatin modification activity that leads to a closed chromatin conformation, inaccessible for the transcriptional machinery. T₃-binding induces a conformational change of TR that will lead first, to the release of the corepressor complexes and second, to the recruitment of coactivator complexes carrying a different set of chromatin modification enzymes. Their actions lead to chromatin opening favorable to transcription activation.

The expression profiles (Yaoita & Brown, 1990), together with the ability of TR to both repress and activate T₃-inducible genes in the absence and presence of TH (Sachs & Shi, 2000), respectively, suggest dual functions for TRs during development (Sachs et al., 2000). TR α and TR β mRNA are present at very low levels during embryogenesis where their function has started to be addressed (Havis et al., 2006). Next, high levels of TR α mRNA are present after larval hatching and increase to reach a maximum during metamorphosis. TR β mRNA levels are barely detectable before metamorphosis, when they will increase in parallel with endogenous T₃ level, again reaching a peak at the climax. After metamorphosis, the levels of both TR isoforms decrease to stay low in the juvenile and the adult. The same profiles were observed analyzing protein levels (Eliceiri & Brown, 1994). The tissue distribution of TR has shown to be correlated with organ transformation (Eliceiri & Brown, 1994; Fairclough & Tata, 1997; Kawahara, Baker, & Tata, 1991). Thus, in premetamorphic tadpoles, TRs, mostly TR α , act to repress T₃-response genes. As many of these genes are likely to participate in metamorphosis, their repression by unliganded TR will help prevent premature metamorphosis and ensure a proper period of tadpole growth. TH synthesis and secretion into the plasma transforms TRs from repressors to activators, which will induce the expression of TH response genes leading to metamorphosis.

Analysis of TH action in amphibian metamorphosis will provide a powerful tool to understand the diversity of biological activities known for TH and the mechanisms that lead to this diversity. Studies in the past two decades using subtractive hybridization or DNA array have identified many T₃-response genes during amphibian metamorphosis (Brown et al., 1996; Buchholz, Heimeler, Das, Washington, & Shi, 2007; Buckbinder &

Brown, 1992; Cai, Das, & Brown, 2007; Das et al., 2006; Das, Heimeler, Buchholz, & Shi, 2009; Shi & Brown, 1993; Wang & Brown, 1991, 1993). Among them, only a small fraction has been characterized as direct response gene (Das et al., 2009; Furlow & Brown, 1999; Rangan, Wong, & Shi, 1994). The identification of the TH-induced transcriptional regulatory programs needs now to be addressed in a physiological context at the level of the whole genome to understand how TH regulates metamorphosis. Such ambitious studies depend on the exploitation of a sequenced amphibian genome. While *Xenopus laevis* (*X. laevis*) is the most used model, *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*) is by far a more appropriate model because its genome sequence is in a large part already accessible (Hellsten et al., 2010). Now next-generation sequencing (NGS)-based transcriptome sequencing, transcription factor binding, and epigenetic analyses (chromatin modification) have dramatically changed how fundamental questions in biology are addressed (Hawkins, Hon, & Ren, 2010; Metzker, 2010; Stoner, Mu, Greenbaum, Auebach, & Gerstein, 2011). NGS is well suited to provide all the primary data required for functional genomic analyses with an unprecedented resolution enabling the detection of even subtle differences. This review emphasizes the particular contribution of NGS-based technologies to functional genomics research with a special focus on gene regulation by TH.

2. XENOPUS TROPICALIS GENOMIC SEQUENCE AND ANNOTATION: CURRENT STATE

2.1. A fragmented genome assembly

The sequencing of *X. tropicalis* genome has been an ongoing project for nearly 10 years. It was initiated by the JGI in late 2003, and the first public version (3.0) was released in October 2004. The draft assembly version 4.1 released in 2005 had been in use for over 5 years before its publication (Hellsten et al., 2010). A new assembly (version 7.1) quickly followed and was made available to download on the XenBase Web site in 2011 (Bowes et al., 2008). These assemblies have been an invaluable resource for the scientific community. In fact, as opposed to *X. laevis*, which is pseudotetraploid and has a genome of about 3.1 Gbp, *X. tropicalis* has a relatively small genome (1.7 Gbp) and much less genetic redundancy. This is expected since it is a diploid species, making it a very appropriate model to probe, for example, the TH-induced gene regulatory networks. This

general purpose genomic resource has been instrumental in key recent findings of *X. tropicalis* biology (Bowes et al., 2008; Hellsten et al., 2010).

Unlike mouse and human genomes, *X. tropicalis* genome project did not benefit from the inputs and curations of a large and extensive scientific community. Indeed, this is the case for almost all eukaryotes genomes published so far, except for a few model organisms. As a result, the draft genome assembly v4.1 of *X. tropicalis* is composed of 19,501 scaffolds (see Fig. 10.1A; Buisine & Sachs, 2009) representing unordered fragments of the 10 chromosomes (Tymowska & Fischberg, 1973). In the version 4.1, the largest scaffold is 7.8 Mb long and the N50 = 1.6 Mb. The version 7.1 is quite less fragmented, with only 7730 scaffolds, an N50 of 130 Mb, with the longest scaffold being 216 Mb long. Interestingly, a small number of the largest scaffolds capture a majority of the genes: 80% of the Ensembl genes in the 834 top scaffolds (Fig. 10.1A). In addition, many assembly gaps (stretches of “N”s corresponding to unsequenced regions) are found in scaffolds and add an extra level of fragmentation (Fig. 10.1B and C). Given that many multixon genes are several tens of kilobases long, such gaps will frequently be found in gene loci, resulting in alteration of apparent distances (Fig. 10.1B), as well as missing exons or gene fragments. Thus, although most of the genome sequence is reflected by a small subset of scaffolds (80% of the assembly in the top 2000 scaffolds), fragmentation remains high (Fig. 10.1C). BAC, cosmid and fosmid libraries have been end-sequenced to resolve the physical continuity over large size range (Hellsten et al., 2010). Nonetheless, end-sequenced scaffolds are still present in the assembly, artificially increasing the size of the assembled genome by ~85 Mbp. They cluster as dense clumps of points on Fig. 10.1A (highlighted by the three leftmost ellipses). In addition, some regions (end-sequences) may be represented multiple times in the genome sequence. While the assembled genome is 1.5 Gbp long, one has to take into account that overall, 20% of the released assembly is actually not sequenced. However, unassembled regions of the genome assembly result from low complexity regions, or repeated sequences, which makes both base detection—in the case of long stretches of similar nucleotides—and assembly—because of the ambiguity introduced—more difficult. In addition, assembly gaps could also be due to the presence of allelic polymorphism, which could induce hard to resolve ambiguities during the assembly process. Intraspecific polymorphism can be ruled out in the case of *X. tropicalis* since only one inbred individual frog was used for genome sequencing (Hellsten et al., 2010).

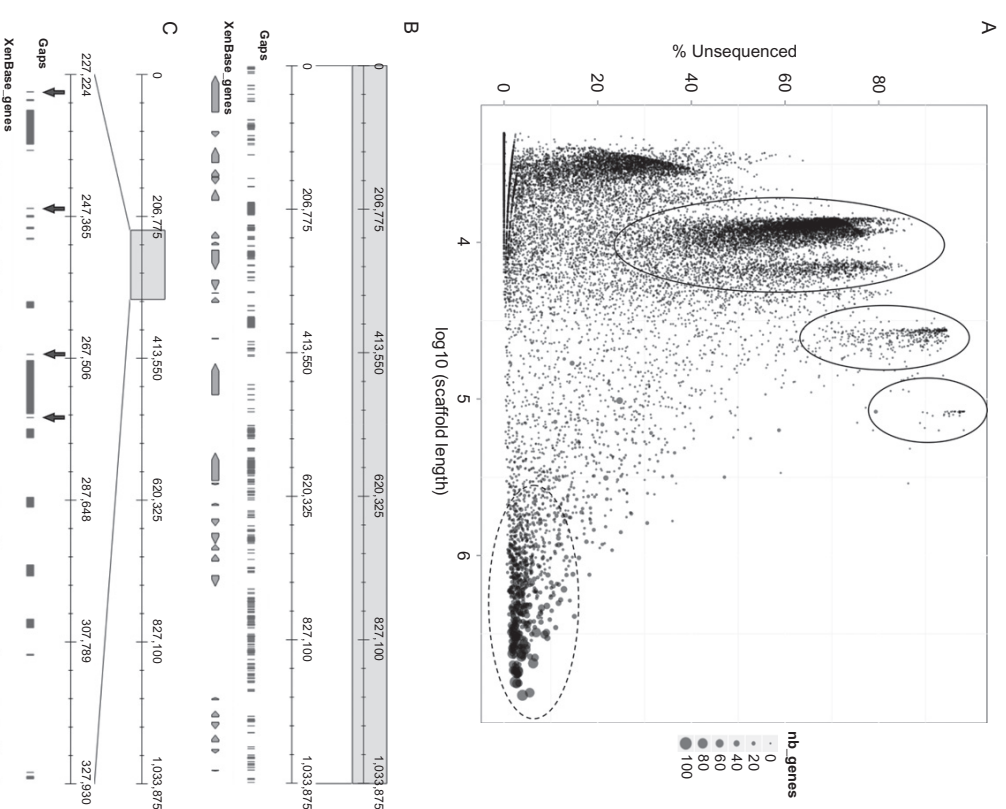


Figure 10.1 The *X. tropicalis* genome assembly 4.1 is highly fragmented. (A) Scatterplot representing the size of each scaffold (in $\log_{10}$ scale) compared to the proportion of assembly gaps (% Unsequenced). The gene number per scaffold (ranging from 0 to 100) is indicated by gray circles of various sizes. The three ellipses in the upper half of the plot correspond to a fraction of the cosmid, fosmid, and BAC-end libraries used to help the assembly process. The gene rich and almost fully sequenced scaffolds capturing ~80% of the assembly are indicated at the bottom-right of the plot (dashed-circle). (B) Illustrative example of the assembly gaps found in a scaffold. The first track shows the assembly gaps (stretches of “N”s). The second track represents XenBase gene models. The orientation of each gene is indicated by the direction of the arrow. The scaffold shown is scaffold_448. (C) Close-up of a 100 kb region of the scaffold_448. Assembly gaps that are exactly 50 bp long (“gaps of 50,” see text) are indicated by arrows.

A specific subset of assembly gaps find their origin in a technical choice made during the assembly process. Indeed, nearly half of the $\sim 170,000$ assembly gaps are exactly 50 bp long. They were in fact arbitrarily introduced when the length of an unsequenced region could not be determined. They are heterogeneously distributed across the genome and can be found both inside of genes as well as in intergenic regions (Fig. 10.1C). The use of the gPET technology (Fullwood, Wei, Liu, & Ruan, 2009) suggest that the size of these “gaps of 50” is in fact underestimated by at least an order of magnitude, although the individual size of each gap is subject to large variations (unpublished data). Such inconsistencies can have a dramatic impact in the exploitation of the genome sequence as a general purpose resource by a biologist unaware of these pitfalls, since regions apparently close together can actually be located several kilobases apart from each other. This is not much of a problem when studying a small region of the genome which can be visually inspected (in the range of a few hundred base pairs up to a few kilobases), but this can become a real issue when large genomic regions are being analyzed. Furthermore, annotated features as short as 50 bp do not show up well in genome browsers when displaying genomic regions larger than 10 kbs, which deprives the biologist of visual clues for regions containing “gaps of 50.” Of note, this point has been partially corrected in the version 7.1, although 42% 47,505 assembly gaps are exactly 100 bp and 10 kb.

2.2. An incomplete annotation

Despite the fragmentation level of the genome assembly, the majority of genes are included in the longest scaffolds (Fig. 10.1A, bottom-right circled cluster), which supports the idea that the current assembly contains most of the gene rich (euchromatic) regions. Many different gene annotation datasets are available for *X. tropicalis*: Ensembl (Flicek et al., 2012), XenBase (Bowes et al., 2008), and RefSeq (Pruitt, Tatusova, Klimke, & Maglott, 2009). They are more or less comprehensive, redundant, and complementing each other. For example, while Ensembl has more gene models than XenBase (18,025 vs. 15,929 out of more than 22,000 expected), it also has more models with no associated name (“unknown,” 6293 vs. 1074). In fact, as shown in Fig. 10.2A, the three databases provide gene models that are quite comparable qualitatively, but clearly lack consensus in the definition of their boundaries. Indeed, the operational value of a genome sequence is (in part) dictated by the quality of its structural and functional annotations.

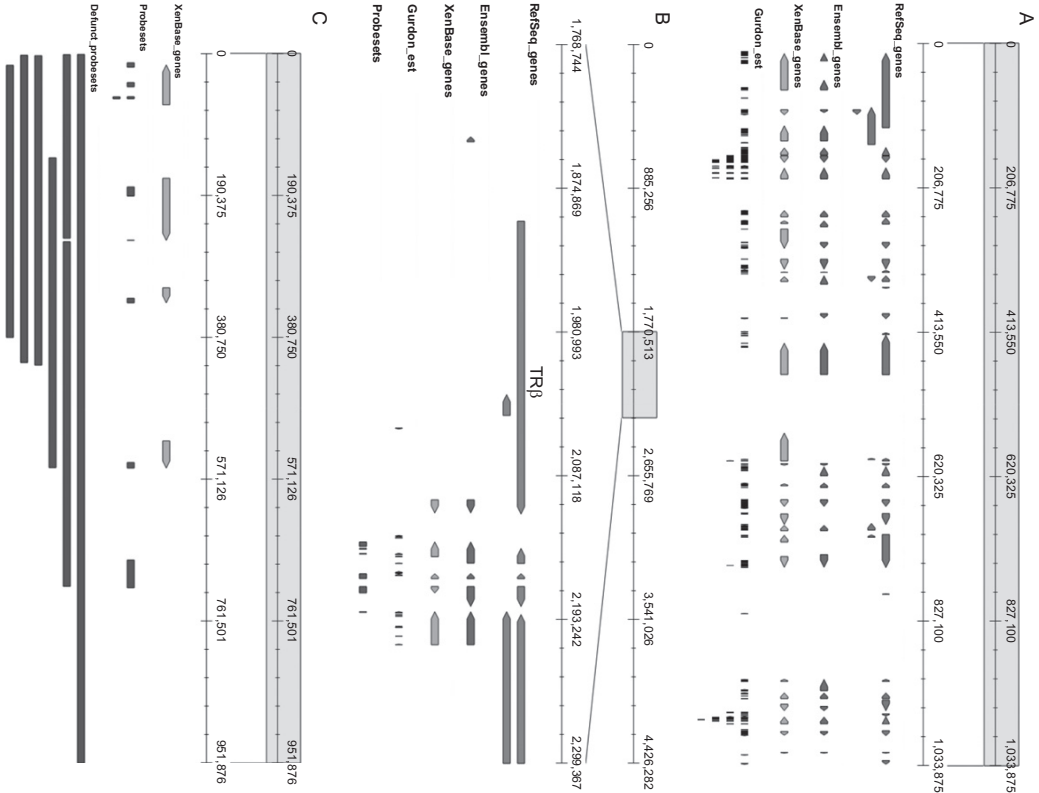


Figure 10.2 Limits of the current gene annotation and microarray design. (A) Comparison gene annotations from different sources. The first three tracks represent gene models described in RefSeq, Ensembl, and XenBase. The orientation of each gene model is indicated by arrows. The fourth track corresponds to the EST clusters computed at the Gurdon institute (available on the XenBase website). The scaffold shown is scaffold_448. (B) Affymetrix probesets located around the *TRβ* locus (scaffold_26). The four top tracks correspond to the same datasets as in A. The last track represents the genomic region spanned by the Affymetrix *X. tropicalis* transcriptome microarrays probesets, curated from defunct probesets. Note that there are no probeset associated with *TRβ*. Thus,

Precise definition of gene boundaries is of utmost importance when trying to link coordinated variation of gene expression with the specific recruitment of transcription factors or modification of the chromatin architecture. In particular, most of the current gene models capture only the coding sequence (CDS), without taking into account the untranslated regions (UTRs). The upstream boundary of the 5'UTR defines the actual transcription start site (TSS) and proximal promoter region, with which many regulatory elements are associated and which are required for transcriptional regulation. The same is true for 3'UTRs, which are underrepresented and often contain numerous microRNA-binding sites, which may be important posttranscriptional regulators.

Traditionally, the definition of gene models relies on the use of a collection of softwares (*ab initio* gene prediction, comparison to databases, etc.) and functional data (ESTs, full-length cDNA, etc.). Between 2000 and 2007, the number of EST for *X. tropicalis* has increased tremendously, reaching more than 1.2 million ESTs (grouped by unigene library entry, ~5 million altogether), making it one of the model with the highest number of ESTs. The ESTs were clustered and aligned to the genome sequence in order to define potential exons (Nagaraj, Gasser, & Ranganathan, 2007). Although this strategy can be quite effective when large collections of EST are used, the process remains error prone (depending on the quality of the collections) and often lacks the resolution required to describe alternative transcripts (Nagaraj et al., 2007). As can be seen in Fig. 10.2B, the gene TR β is associated to a single EST cluster far upstream of the annotated TSS in Ensembl or XenBase, while only the RefSeq annotation reflects boundaries that actually encompass the EST cluster.

Gene models can be inferred from the genomic sequence using computational methods. Popular gene prediction softwares include genewise (Birney, Clamp, & Durbin, 2004), geneMark, FGENESH (Salanov & Solovyev, 2000), and EUGENE (Schix, Moisan, & Rouzé, 2001), to name a few. This process suffers several pitfalls and always benefits from multiple lines of evidence. In addition, assembled genome must be of relatively good

TR β transcription cannot be measured with Affymetrix arrays. (C) Illustrative example of defunct Affymetrix probe sets. The defunct probe sets are composed of probes poorly specific of a given gene/transcript. The first track corresponds to the XenBase gene models as in (A). The second track corresponds to genomic region spanned by the curated probe sets that can be used for analysis, while the third track (defunct probe sets) corresponds to the genomic region spanned by defunct probe sets. The region shown is located on scaffold_464.

quality, as unsequenced portions as well as assembly errors can lead to missing or truncated gene models. Also, the information content along the genome can be extremely variable, in such a way that pseudogenes, duplications, short tandem repeats, and the overall complexity level of a region can mislead the software. Many misannotated gaps inside the gene body, as shown in Fig. 10.1C, can further reduce the efficiency of gene prediction. Furthermore, predicted gene models are often limited to the CDS, and miss UTRs which, as previously stated, often contain important regulatory elements. In *X. tropicalis* genome, some key genes involved in metamorphosis or TH signaling are poorly annotated, which can hamper downstream analysis of functional data. For example, based on the current annotation, it would be impossible to find the T₃RE located at the TSS of TR β by looking for it near the 5' end of the gene (a very common practice, although many binding sites may be missed as they are located away from the TSS, see below). In fact, the 5' end of the TR β gene was determined by 5' RACE PCR and is correctly annotated only in the manually curated RefSeq database. It is located 210 kb upstream of the XenBase and Ensembl models (Fig. 10.2B).

Gene models can be determined by full cDNA sequencing (Klein et al., 2002; Voigt, Chen, Gilchrist, Amaya, & Papalopulu, 2005). Although this method is quite expensive and slow, it is also very accurate. Individual cDNA clones are assembled from multiple single-pass sequenced reads, ensuring the whole coverage of the cloned molecules. When combined, these approaches can yield accurate models, although extensive curation is still required. While there is an expected ~22,000 protein coding genes, only half are actually linked to accession numbers pointing to cDNA in the RefSeq database, and only one-third are linked to full-length cDNA (Gilchrist, 2012).

The lack of clear definition of gene boundaries renders the analysis of coordinated variation of gene expression quite tricky. In fact, genome-wide measure of differential gene expression has traditionally been carried out using microarrays, whose design relies heavily on a good annotation (Altman et al., 2001). In this technology, fluorescent labeled cDNA is hybridized to probes fixed on a solid surface. The readout of the signal for a given spot then depends on the relative amount of cDNA present in the sample. On the chip, transcript-specific probes define probe sets, with the redundancy of the individual probes allowing the assay to be more specific and sensitive. The design of microarrays thus requires a comprehensive annotation, and the quality and exhaustiveness of the chip will greatly depend on it. In model organisms (mouse, *drosophila*, etc.), microarrays have been

constantly refined, and inconsistent probes were detected in the numerous datasets available in GEO and Array Express and then excluded from analyses. In *X. tropicalis*, the number of microarray datasets available in the databases has not reached the critical value needed to do such curation, and large portion of the probes present on available microarrays are not usable, as they are located outside of exons/genes, or in misannotated regions. As a result, probesets (i.e., a collection of probes aimed at measuring the expression level of a single transcript or gene) often span over large genomic regions, irrespective of the underlying gene definition provided by the annotation (Fig. 10.2C). In addition, after filtering of the defunct probesets, the remaining probesets do not interrogate the whole transcriptome. For example, some genes critically involved in metamorphosis, like TR β (Fig. 10.2B), are missing in the probesets.

3. TH AND TR REGULATING NETWORK USING NGS-BASED TRANSCRIPTOME ANALYSIS

3.1. Toward a better annotation

Traditional resources used to annotate genomes are either low-throughput (in the case of EST and full-length cDNAs) or error prone (in the case of *de novo*, *in silico* predictions) and they are combined to take the best of both and increase specificity and sensitivity of gene prediction methods (see above). The recent rise of NGS technologies and their applications to RNA sequencing (RNA-Seq) opens new perspectives in term of genome annotation, given their very high throughput, scalability, and robustness (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009). RNA-Seq is reminiscent of EST sequencing, except that the sequencing step is carried out by an NGS system rather than a conventional capillary sequencing system. To this end, cDNAs are synthesized by reverse transcription from oligo-dT purified messenger RNAs, and sheared in smaller fragments suitable for sequencing. With regular RNA-Seq, only one end of each fragment of sheared cDNAs is sequenced over a short region, typically ≤ 50 bp. Sequence reads are then mapped onto the genome with one of the many short reads aligners. This simple protocol is best suited for quantitative measure of gene expression, as the normalized number of reads per gene is proportional to its expression level, but can also provide a quick description of transcription units (Garber, Grabherr, Gutman, & Trapnell, 2011). This is well illustrated in the case of the TR β gene (Fig. 10.3A), in which the RNA-Seq signal can be detected

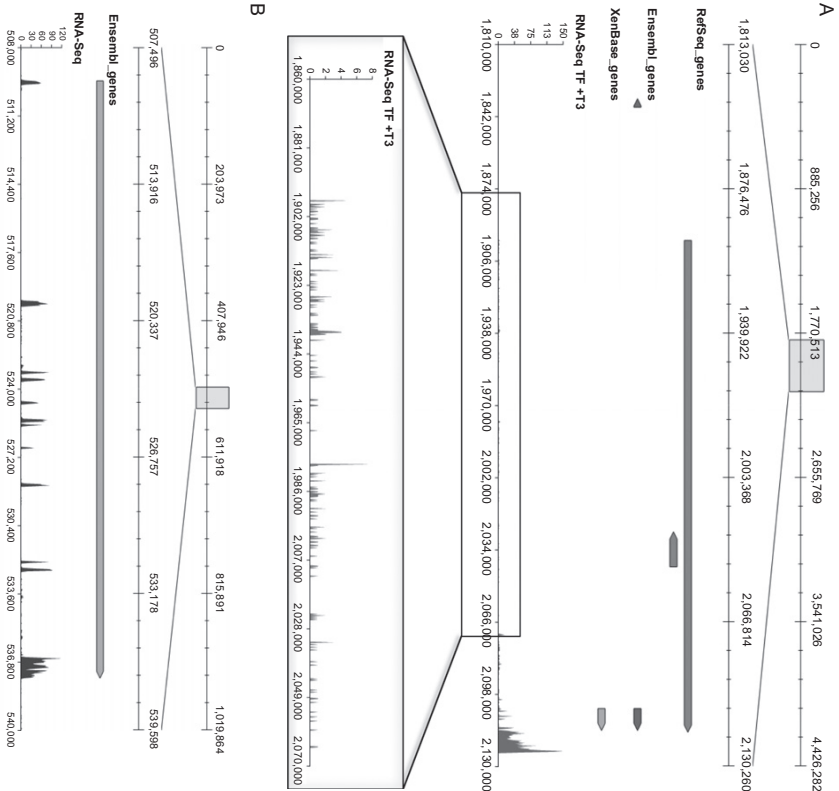


Figure 10.3 RNA-Seq profiling provides a quick overview of transcription units. (A) RNA-Seq profile at the TR β locus. The first three tracks represent the gene models from the same databases as in Fig. 10.2. The fourth track represents the RNA-Seq profile obtained from the tail fin of premetamorphic tadpoles treated with T $_3$. The bottom part is a close-up of the TR β transcription unit which is occupied by the very strong signal at the 3' end of the gene. (B) Conventional RNA-Seq does not provide information on alternative splicing: Example of the wntless homolog (wls) on scaffold_431. The first track represents Ensembl gene models. The second track corresponds to the RNA-Seq profile. The third track corresponds to annotated exons and indicates two known alternative transcript are generated by exon skipping (connecting lines).

up to 210 kb upstream of the TSS annotated in XcBase or Ensembl databases. A limiting factor of conventional RNA-Seq is related to the length of the sequence reads (≤ 50 bp), that can be difficult to map when they overlap over two exons or when exons are small. Because of this, conventional RNA-Seq does not allow precise definition of exon boundaries and is not well suited for the definition of genes structure. This technical limitation is overcome with longer reads of 75–100 bp, and pair-end sequencing, which allows a better resolution when defining exons boundaries (Fig. 10.3B) (see below). This technology has been successfully used to refine current gene models in *X. tropicalis* (Akkers et al., 2009).

Several recent protocols allow longer sequence reads (≥ 100 bp) and pair-end sequencing, in which the two ends of each cDNA fragment are sequenced. Although the analysis is more complex, these protocols are well suited for *de novo* transcript reconstruction, exon definition, detection, and quantitative measure of alternative splicing. Two strategies can be used to process the sequenced reads (Garber et al., 2011): The reads can be assembled into transcripts, including splicing variants, which can be mapped to a reference genome, thus providing exon annotation. Alternatively, the reads can be mapped directly to the reference genome, without *de novo* assembly, and alternative splicing can be inferred from reads split in two and mapping over the ends of two distinct exons (also known as “spliced reads”). These methods provide a single base pair resolution of exon boundaries.

The 5' end of transcripts are often missed and are poorly annotated. To this regard, the RNA-PET technology holds many promises. Originally developed to detect fusion transcripts in cancer cells, the RNA-PET specifically captures the 5' and the 3' ends of transcripts (Ruan & Ruan, 2011). The principle of this method is depicted in Fig. 10.4A. Full-length cDNA is synthesized from mRNA transcripts with CAP-Trapper and Gsul-dT(16) purification. A linker containing the binding site of the MmeI (or EcoP15I) endonuclease is then ligated to the full-length cDNA, allowing it to be circularized. The circular DNA molecule is then restricted with *MmeI*, which cuts 27 bp downstream of its binding site, thus resulting in 27 bp tags of each end of the original transcript, spaced by the linker. Sequencing adaptors are then ligated for high-throughput sequencing. The resulting paired-end tags (PETs) are then mapped to the genome, thus providing experimental evidence for the 5' and 3' ends of transcripts, including potential alternative TSS and transcription termination sites (TTSSs), but provides no information relative to their internal structure (Fig. 10.4B). Thus, RNA-PET provides complementary information about the boundaries of the transcriptional

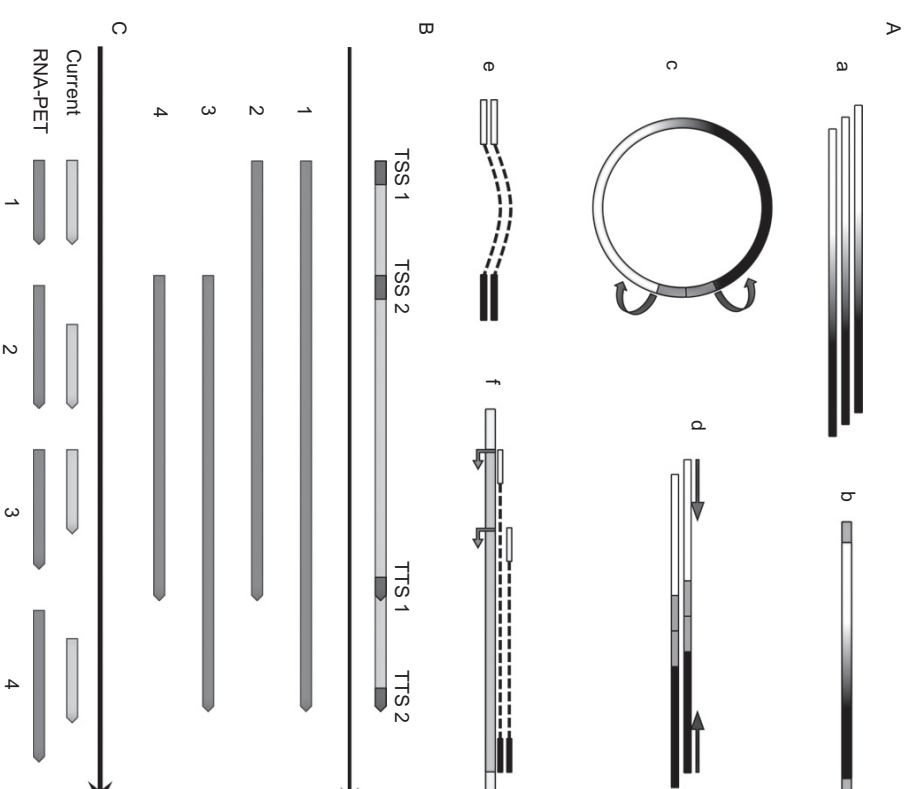


Figure 10.4 Principle of RNA-PET. (A) The starting point of full-length cDNAs made from poly-A RNA (a), on which linkers containing *MmeI* (or *EcoP15I*) restriction sites are ligated (b). The resulting molecules are circularized and restricted with *MmeI* (c), which cuts DNA 27 bp downstream of its binding site and thus produces a linear fragment containing the two ends of the original transcript separated by the linker (d) prior to deep sequencing (from each end). The resulting paired-end tags (PETs) contain information about the association of one transcript extremity to the other—respectively, white and black rectangles—(e). After mapping on the reference genome, this provides experimental evidence for the location of the 5' and 3' ends of transcripts (f). (B) Since RNA-PET captures the 5' and 3' ends of transcripts, it can be used to measure the relative abundance of transcripts that use alternative TSS or TTS (dark segments on the full gene model). (C) RNA-PET can improve the annotation of transcription units and thus gene boundaries. From left to right, RNA-PET determined gene boundaries (dark gray) can concord (1) with the current annotation (light gray), or extend in 5' (2), 3' (3), or both (4) extremities.

units, by confirming current models or redefining them at their 5', 3' (or both) ends (Fig. 10.4C). The potential of RNA-Seq coupled to RNA-PEt in term of genome annotation is therefore tremendous.

3.2. NGS provides functional data to analyze TH-induced differential expression

Amphibian metamorphosis involves extensive modifications/remodeling of the organism as a whole. Since this biological process is strictly controlled by TH, documenting expression variation of TH-responsive genes is central to understand the molecular mechanisms controlling metamorphosis, decrypt the gene network controlled by TH, and its spatial and temporal dynamics. In the pre-NGS era, the simultaneous measure of the expression level of thousand of transcripts was carried out by microarrays. Yet, as discussed in a previous section, this high-throughput technology is not “naïve” *per se*, in that the design of the microarrays is based on a prior knowledge of the transcripts to be detected. Indeed, RNA-Seq can benefit from the evolution and ongoing curation of a genome annotation, whereas detecting novel transcripts with microarrays would require a new design. In fact, important genes involved in amphibian metamorphosis might not even be represented on the chip (e.g., TR β gene on *X. tropicalis* Affymetrix array, see above). Nowadays, in the NGS era, RNA-Seq represents a more naïve, genome-wide alternative for measuring gene expression, in that the strength of the method is not based on a prior knowledge of transcripts, or gene annotation (Fig. 10.3). For example, in the case of TR β , even if the gene is not well annotated, the RNA-Seq signal spreads over 210 kb and can be assigned to it *a posteriori*, whereas this is not possible with microarrays. RNA-Seq also has the benefit of having a much larger dynamic range than microarrays (Kabaji *et al.*, 2011). In fact, the hybridization step in RNA-Seq is carried out *in silico*, which provides full control over it, and does not saturate. This is in contrast with microarrays, with which the hybridization signal can quickly reach the saturation limit of the photomultiplier. Once RNA-Seq data have been mapped to either a reference genome or transcriptome, several layers of analysis can be carried out. The absolute level of gene expression can be measured by computing the reads per kilobase of exon model per million of mapped reads (RPKM) value. Additionally, if several samples have been subject to the same analysis, one can perform differential analysis in a manner similar to that of microarray data, but using read count instead of photons. As shown in Fig. 10.5A, the expression of the TH regulated gene THb/ZIP is strongly induced upon T₃ treatment. Although the THb/ZIP gene

model and the Affymetrix microarray probesets partially overlap with the RNA-Seq signal (indicating that they can be used to assess the expression levels of the gene), a better measure of gene expression is achieved when counting the RNA-Seq reads along the entire gene. This is clearly shown in Fig. 10.5A, where the RNA-Seq signal extends up to 5 kb upstream of the annotated TSS for THb/ZIP, or even ~200 kb for TR β (Figs. 10.3A and 10.5B). If read count was restricted to the annotated region, a lot of signal could actually be missed, potentially introducing biases comparable to those found in microarray analysis. In this context, using RNA-PEt to define precise gene boundaries would prove particularly helpful in achieving better differential analysis of RNA-Seq data.

In addition, when using RNA-Seq derivatives (Wang *et al.*, 2009), fragments spanning multiple exons can be easily mapped to the genome or transcriptome, giving precise data about the expression levels of the various alternative transcripts (Fig. 10.3B). Furthermore, beyond the strict definition of exon boundaries, RNA-PEt can provide important data about TH effect on alternative TSS and TTS usage (Fig. 10.4B). The best-case scenario for accurately measuring gene expression with RNA-Seq requires high quality gene models.

4. TR INTERACTOME

4.1. Whole genome TR mapping

Recent advances provide the technologies to go beyond the simple measurement of transcripts abundance, making it possible to investigate the detailed molecular mechanisms involved in the transcriptional dynamics of TR mediated regulatory cascades.

Upon binding to T₃RE, TR recruits cofactors that will modify the transcriptional permissiveness of chromatin (Wong, Shi, & Wolffe, 1995). Although T₃RE are located near TH regulated genes (Ranjana *et al.*, 1994), recent experimental evidence on the regulation of gene expression by transcription factors involves loop-mediated physical interactions between regulatory factors bound to DNA at distant enhancers and the core transcriptional machinery located at the TSS of regulated genes (Fullwood, Liu, *et al.*, 2009). In fact, in a manner similar to other transcription factors, TR could regulate the expression of target genes over long genomic distances (up to several tens of kilobases, unpublished data), although some TR-binding site are located nearby TH-responsive genes.

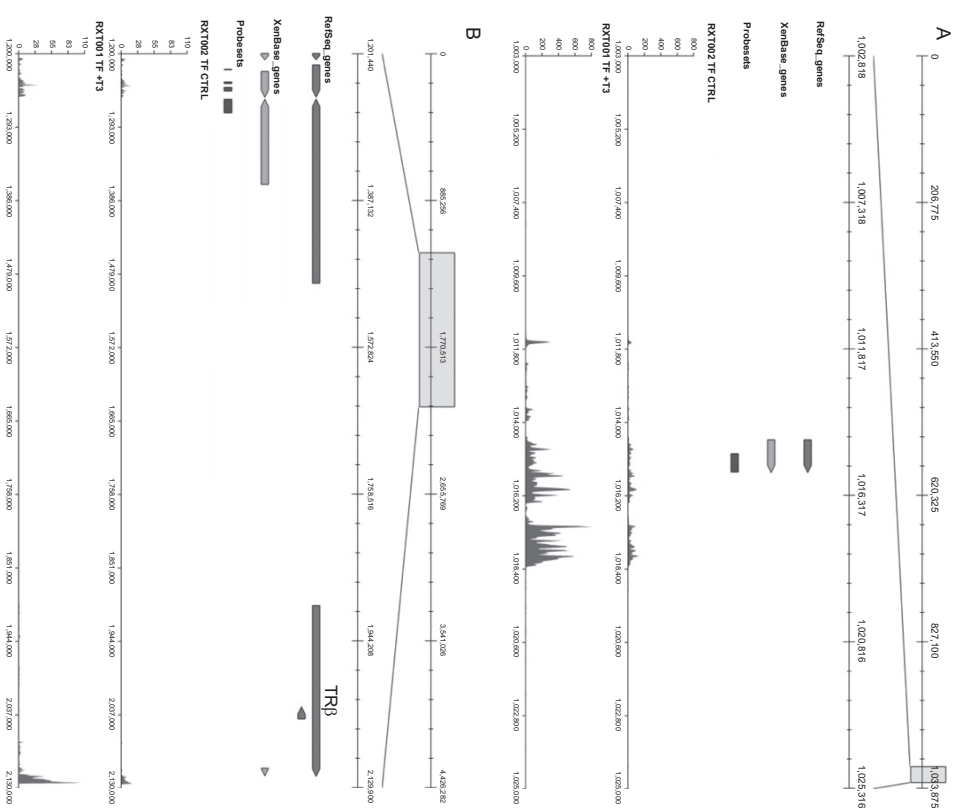


Figure 10.5 RNA-Seq is less limited than microarrays for quantitative measures of gene expression. (A) Genome view of the Thb/ZIP locus. The first two tracks represent the RefSeq and XenBase gene models. The second track represents the (curated) probesets from the commercially available X. tropicalis Affymetrix microarray, with which the expression level of Thb/ZIP appears induced 2.8 fold. The last two tracks correspond to the RNA-Seq profiles before and after T₃ treatment, respectively. In this case, the induction level is ~fivefold, which fits better with RT-qPCR data. (B) Genome view of the TRβ locus. The tracks are the same as in A. No probeset is associated to the TRβ gene (on the right-hand side of the panel), as opposed to other genes (left-hand side). Thus, the Affymetrix microarray cannot monitor the expression of a key regulator of metamorphosis.

The canonical T₃RE sequence is well defined and it could be tempting to perform an exhaustive search of this motif genome wide with tools such as NHRscan (Sandelin & Wasserman, 2005). Unfortunately, given its small size and degeneracy, search for this motif will be flooded by strong statistical noise (Fig. 10.6A). For example, more than 200,000 DR4 could be found across the genome. However, it is improbable that there are this many binding sites across the X. tropicalis genome, given that so far, the number of nuclear receptor binding site in a genome has been estimated between 2000 and 10,000 (Hamza et al., 2009; Nielsen et al., 2008; Welboren et al., 2009). In addition, identifying canonical DR4 motifs does not guaranty finding functional TR-binding sites. Indeed, TR was shown to bind other motifs (e.g., ER6 and DR1, see Desvergne, 1994). Nuclear receptors can also bind to motifs that depart significantly from the canonical motif (Zimngibl, Chan, & Aubin, 2008). Thus, it is imperative to use methods such as chromatin immunoprecipitation (ChIP) to provide experimental evidence of TR binding at specific genomic locations. To this end, protein-protein and protein-DNA interactions are stabilized by cross-linking, and chromatin is fragmented by sonication to a size range of 200–400 bp. The DNA fragments bound to the protein of interest are captured by immunoprecipitation with a specific antibody against the protein. After de-cross-linking and purification, the resulting DNA sample is enriched with the fragments originally associated with the protein. These samples can be subject to different detection techniques. With conventional ChIP–qPCR, the abundance of a known DNA fragment is measured by real-time quantitative PCR (qPCR). This method, which requires to know *a priori* the genomic region being monitored, has proved to be remarkably helpful in the context of amphibian metamorphosis to measure the differential binding patterns of TR in the vicinity of the TRβ gene, as well as the dynamics of histone modifications (Bilestimo et al., 2011). Although it is a very efficient technique, its throughput is very low and labor intense, since every location has to be tested individually by qPCR, and it requires to know *a priori* where to look for binding. With the ChIP–Seq technology, the detection method involves sequencing the purified DNA fragments. In this case, the number of sequence reads per genomic location provides a quantitative measure of DNA binding. This approach is naive and does not rely on prior knowledge of the putative binding sites, and rather provides genome-wide binding profiles (Fig. 10.6B).

The profiling of a few chromatin modification marks as well as RNA-Polymerase II occupancy has been carried out on X. tropicalis early

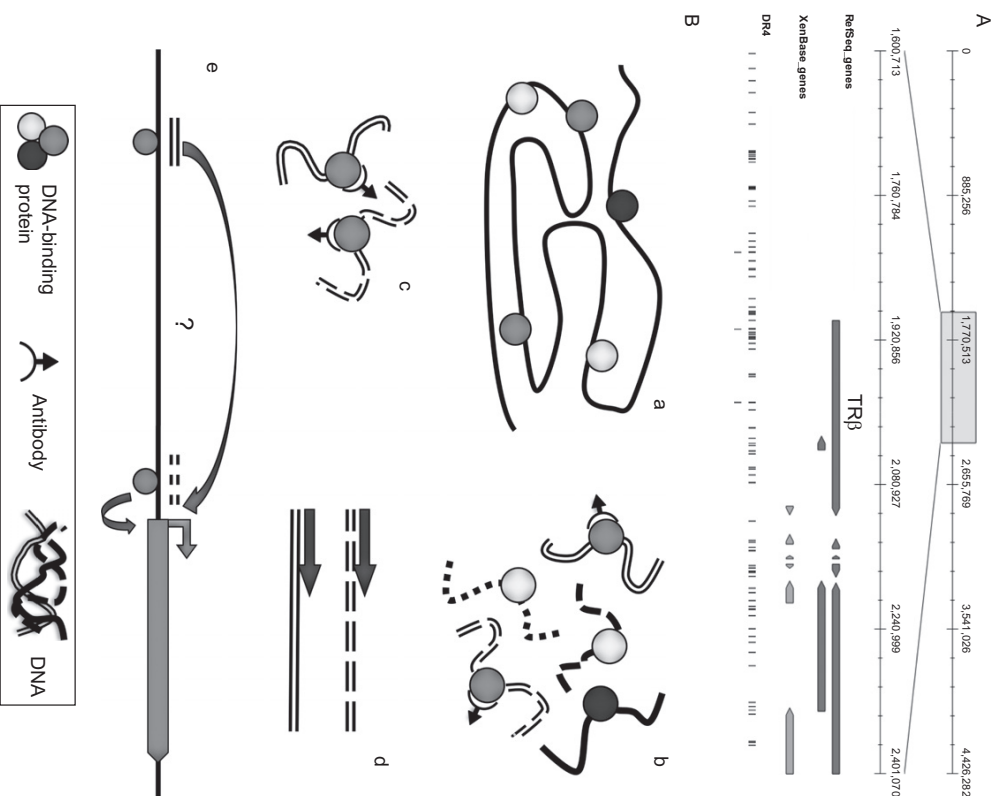


Figure 10.6 ChIP-Seq is a naive alternative to *in silico* predictions for mapping DNA-binding sites. (A) Genome view of the TRβ locus. The first two tracks represent the XenBase and Ensembl gene models, respectively. The third track represents 21,424 putative DR4 found in this region with a modified version of NHRscan (Sandelin & Wasserman, 2005). (B) Principle and limitations of ChIP-Seq. Physical interactions between chromatin components (protein, DNA) are stabilized by cross-linking (a). Chromatin is then fragmented by sonication in fragments of 200–400 bp (b). The DNA-binding sites are captured by immunoprecipitation with a protein-specific antibody (c). After cross-link reversal, the DNA sample is purified and sequenced (d). Binding density profiles are derived from sequenced reads after mapping to the reference genome, and provide an accurate description of the binding sites (e). Transcription factors (TFs) regulate the transcription of target genes after binding to DNA at enhancers, which can be located far from genes. Unfortunately, ChIP-Seq cannot connect DNA-binding sites of TFs to their target gene and thus cannot be used to describe the topology of gene regulatory networks.

development (Akkers et al., 2009), but not on amphibian metamorphosis. It would be of great interest to derive genome-wide TR-binding profiles to help understand the underlying mechanistic events of amphibian metamorphosis.

However, as seducing as it may sound, ChIP-Seq suffers from a major limitation as it provides no experimental evidence of the target gene(s) whose transcription is regulated by the DNA-bound transcription factor, if any. At best, one assumes that the target gene is located nearby the DNA-bound transcription factor, and infers such functional connection. Although this might be true for a few genes, this postulate is clearly not true genome wide (see below). It is clear that DNA-bound transcriptional regulators can act over large genomic regions and physically interact with the basal transcription machinery through DNA looping (Kim, Brennick, & Bultman, 2009). Also, transcriptional regulators can interact with one another, thus adding more complexity (Fullwood, Liu, et al., 2009).

4.2. A need for 3D analysis

Recent technological breakthrough bypass the ChIP-Seq limitations and proceed a step further in the analysis of functional interactions between DNA-bound proteins. Ten years ago, the development of the chromosome conformation capture (3C) technology allowed to assess physical interactions between chromosome loci (Dekker, Rippe, Dekker, & Kleckner, 2002; de Wit & de Laat, 2012). The throughput was quite low in that 3C was used to detect the physical proximity of two DNA fragments in the nucleus in a “one to one” manner. It also required a prior knowledge of the genomic locations to probe. The first improvements of the 3C technology resulted in the circularized chromosome conformation capture (4C) technique, which allows to probe physical interactions in a “one to many” manner (Simonis et al., 2006; Zhao et al., 2006). In 2009, the Genome Institute of Singapore developed the chromatin interaction analysis by paired-end tags sequencing (ChIA-PET) (Fullwood, Liu, et al., 2009; Fullwood & Ruan, 2009), which combines the principles of ChIP-Seq and 4C, and produces two lines of evidence from a single experiment: a genome-wide binding profile together with a map of the physical interactions between protein-bound DNA regions. It is important to note that this method only reveals if two regions of DNA are close to each other but does not tell which or if any proteins is involved in the interaction. It does not either reveal any physical interactions among proteins, especially if no other proteins are analyzed. The

experimental procedure is quite complex and is aimed at capturing DNA-bound proteins engaging physical contacts with other protein-bound DNA complexes. The procedure can be summarized as follows (Fig. 10.7): DNA-bound protein complexes are captured by immunoprecipitation with a specific antibody, following chromatin fragmentation (this step is similar to that of a regular ChIP). However, as opposed to conventional ChIP, cross-linking is not reversed after this step. Instead, a double-stranded DNA linker containing the binding site of the restriction enzyme *MmeI*, which cuts DNA 27 bp downstream of its binding site is ligated to each end of the DNA fragment. The DNA fragments are then ligated. Two kinds of ligation events can take place: *cis*-ligation (self-ligation of a DNA fragment, providing ChIP-Seq like data but no information on long range interactions) and *trans*-ligation (ligation between two fragments far from each other on the genome but brought close to each other within the large protein-DNA complex). After ligation, the complexes are de-cross-linked, and the ligated DNA fragments are restricted with *MmeI* to produce fragments containing pairs of ends ligated to the linker. After amplification and deep sequencing, they are mapped to the reference genome. One of the strengths of ChIA-PET relative to 3C and 4C is that it can probe “many to many” interactions of DNA regions associated with the protein, be it via interactions of the protein with other transcription factors (Fullwood, Liu, et al., 2009) or core components of the chromatin such as histones or other factors such as insulator-binding proteins (CCCTC-binding protein) (Chepelev, Wei, Wangsa, Tang, & Zhao, 2012; Handoko et al., 2011). As a consequence, in addition to profiling DNA-bound transcription factors, ChIA-PET also provides experimental evidence for physical interactions between DNA regions far away from each other, and thus can unambiguously identify direct target genes.

Using ChIA-PET on TR would help document with unprecedented details the topology and dynamics of regulatory networks of TH regulated genes. Importantly, this would not only provide a genome-wide map of TR binding but also identify direct TR target genes. Perhaps most of all, ChIA-PET will provide us with the opportunity to go beyond the local chromatin organization and probe higher orders of chromatin architecture. Our preliminary data show that indeed, TR can act over large genomic distances and that the local chromatin context might be marginally relevant to understand the mechanisms of TH-induced transcription cascades (unpublished data).

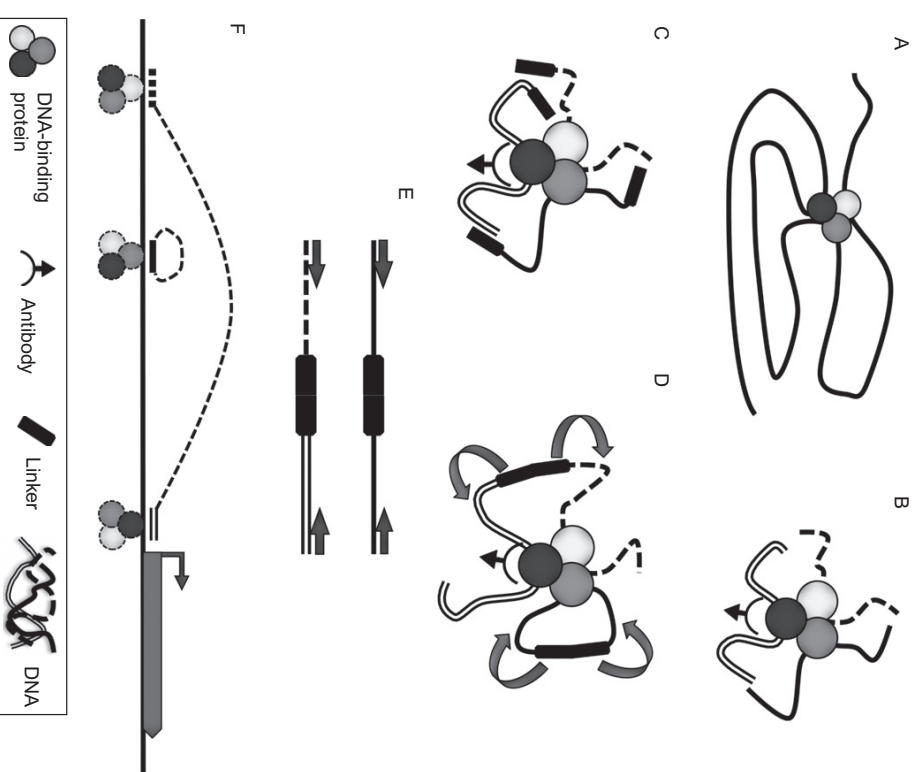


Figure 10.7 ChIA-PET describes DNA-binding sites and their physical interactions through DNA looping. The first two steps of ChIA-PET are similar to those of ChIP-Seq. Briefly, chromatin is cross-linked to stabilize the interactions between its proteins and DNA components and sonicated (A). Complexes are then purified with a specific antibody (B). Double stranded linkers containing the binding site of the *MmeI* endonuclease are ligated to the ends of the fragmented DNA (C). Ligation can occur in *cis*, when a DNA fragment is circularized, or in *trans*, when two different DNA fragments are linked together (D). After restriction with *MmeI*, which cuts DNA 27 bp downstream of its binding site in the genomic fragment (D), the resulting linear fragments are sequenced, providing paired-end tags (PETs) reflecting the ligation products (E). After mapping to the reference genome, *cis*-ligation products are essentially similar to ChIP-Seq end products, and serve to derive binding profiles and identify DNA-binding sites. Given that the two tags of *trans*-ligation products map at distinct genomic locations, they do describe the network of physical interactions between the DNA-bound proteins (F). All the possible ligation products are not shown for the sake of simplicity.

5. CONCLUSION

Metamorphosis is a very common process which marks the transition between embryonic and adult life stages. Not only does it correspond to an ecological transition, in that the ecological niche often differs between the larva and the young adult, it also sets deep anatomical, physiological, cellular, and molecular changes. As such, metamorphosis is a deep, fundamental, and ancient biological process.

The problem of studying amphibian metamorphosis is that amphibian genomes are often polyploids, which adds extra levels of genetic redundancy and complexity, and limits to the tools which can be used to characterize the molecular mechanisms of metamorphosis. In this regard, the diploid *X. tropicalis* presents many advantages. Not surprisingly, at the beginning of genome sequencing, the scientific community quickly committed itself to sequence *X. tropicalis* genome and produced functional genomic resources. These were instrumental for the development of our current perception of the molecular mechanisms of *X. tropicalis* metamorphosis.

The recent breakthroughs in sequencing technologies push once again the scale and the precision of our molecular toolkits a step further. It is now possible to describe with exquisite details the genome-wide remodeling of transcriptional programs. Even better, such projects that used to require the combined workforce of one to several research institutes can now be carried out by a single lab. The promises of the molecular dissection of amphibian metamorphosis are enormous. The downside of it is that the current state of the *X. tropicalis* genome assembly and annotation does not reach the standard needed to make use of the full power of these technologies. It is thus important to revisit and update the *X. tropicalis* genomic resources.

The sequencing throughput has increased by three orders of magnitude in the past few years, posing many computing constraints: storage disks space is quickly saturated by the flood of sequencing data (because the advances of hard drive technologies is much slower than the progresses of sequencing throughput), large-scale analysis and processing often require large computing clusters (with their own constraints on dedicated facilities, power consumption, etc.), and data processing through large and complex bioinformatic pipeline. These weaknesses are counterbalanced (in part) by the progress made in software engineering with new and efficient data types, optimized database systems, and computing algorithms.

But perhaps the most challenging is our capacity, as scientists, to embrace the different layers of the technological fields deployed in such projects, which can go from breeding tadpoles in a tank to run metagenomic analysis on a distributed computing system. The success surely lies in the hands of next-generation scientists ([Wickware, 2000](#)).

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the "Centre National de la Recherche Scientifique," the "Muséum National d'Histoire Naturelle," "CRESCENDO," a European Integrated Project funding from FP6 (contract n°LSHM-CT-2005-018652), "IDEAL" a European Large Integrated Project funding from FP7 (n°259679), and "TRIGGER" (ANR-08-JCJC-0100-01). Part of this work was carried out in collaboration with the Genome Institute of Singapore, to whom we are grateful for introducing us to their technologies.

REFERENCES

- Akkers, R. C., van Heerigen, S. J., Jacobi, U. G., Janssen-Megens, E. M., FranCoijs, K.-J., Stummenberg, H. G., et al. (2009). A hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 acquisition in spatial gene regulation in *Xenopus* embryos. *Developmental Cell*, 17, 425–434.
- Almann, C. R., Bell, E., Sczyrba, A., Pun, J., Bekiranov, S., Gaasterland, T., et al. (2001). Microarray-based analysis of early development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 236, 64–75.
- Bilismo, P., Jolivet, P., Alfama, G., Buisine, N., Le Mevel, S., Havis, E., et al. (2011). Specific histone lysine 4 methylation patterns define TR-binding capacity and differentiate direct T3 responses. *Molecular Endocrinology*, 25, 225–237.
- Binney, E. E., Clamp, M. M., & Durbin, R. R. (2004). GeneWise and genomewise. *Genome Research*, 14, 988–995.
- Bowes, J. B., Snyder, K. A., Segertell, E., Gibb, R., Jarabek, C., Noumen, E., et al. (2008). Xenbase: A *Xenopus* biology and genomics resource. *Nucleic Acids Research*, 36, D761–D767.
- Brown, D. D., Wang, Z., Furlow, J. D., Kanamori, A., Schwartzman, R., Remo, B., et al. (1996). The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1924–1929.
- Buchholz, D. R., Heimeier, R. A., Das, B., Washington, T., & Shi, Y.-B. (2007). Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues. *Developmental Biology*, 303, 576–590.
- Bucklinder, L., & Brown, D. D. (1992). Thyroid hormone-induced gene-expression changes in the developing frog limb. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 25786–25791.
- Buisine, N., & Sachs, L. (2009). Impact of genome assembly status on ChIP-Seq and ChIP-PET data mapping. *BMC Research Notes*, 2, 257.
- Cai, L., Das, B., & Brown, D. D. (2007). Changing a limb muscle growth program into a resorption program. *Developmental Biology*, 304, 260–271.
- Chepelev, I., Wei, G., Wangsa, D., Tang, Q., & Zhao, K. (2012). Characterization of genome-wide enhancer-promoter interactions reveals co-expression of interacting genes and modes of higher order chromatin organization. *Cell Research*, 22, 490–503.

- Das, B., Cai, L., Carter, M. G., Piao, Y.-L., Sharov, A. A., Ko, M. S. H., et al. (2006). Gene expression changes at metamorphosis induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis* tadpoles. *Developmental Biology*, 291, 342–355.
- Das, B., Heinmeier, R. A., Buchholz, D. R., & Shi, Y.-B. (2009). Identification of direct thyroid hormone response genes reveals the earliest gene regulation programs during frog metamorphosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 34167–34178.
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., & Kleckner, N. (2002). Capturing chromosome conformation. *Science*, 295, 1306–1311.
- de Wit, E., & de Laat, W. (2012). A decade of 3C technologies: Insights into nuclear organization. *Genes & Development*, 26, 11–24.
- Desvergne, B. (1994). How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100, 125–131.
- Eliciri, B., & Brown, D. D. (1994). Quantitation of endogenous thyroid-hormone receptor- α and receptor- β during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 24459–24465.
- Fairclough, L., & Tata, J. R. (1997). An immunocytochemical analysis of the expression of thyroid hormone receptor α and β proteins during natural and thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus*. *Development, Growth & Differentiation*, 39, 273–283.
- Flannan, F., Gauthier, K., & Samarut, J. (2007). Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Molecular Endocrinology*, 21, 321–333.
- Flicke, P., Anode, M. R., Bartell, D., Beal, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., et al. (2012). Ensembl 2012. *Nucleic Acids Research*, 40, D84–D90.
- Fullwood, M. J., & Ruan, Y. (2009). ChIP-based methods for the identification of long-range chromatin interactions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107, 30–39.
- Fullwood, M. J., Liu, M. H., Pan, Y. F., Liu, J., Xu, H., Mohamoud, Y. B., et al. (2009). An oestrogen-receptor- α -bound human chromatin interactome. *Nature*, 462, 58–64.
- Fullwood, M. J., Wei, C.-L. C., Liu, E. T. E., & Ruan, Y. (2009). Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Research*, 19, 521–532.
- Furlow, J. D., & Brown, D. D. (1999). In vitro and in vivo analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Molecular Endocrinology*, 13, 2076–2089.
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8, 469–477.
- Gilchrist, M. J. (2012). From expression cloning to gene modeling: The development of *Xenopus* gene sequence resources. *Genesis*, 50, 143–154.
- Grimaldi, A., Buisson, N., Miller, T., Shi, Y.-B., & Sachs, L. M. (2012). Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: Lessons from amphibian studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.04.020>.
- Gronemeyer, H., & Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: Nuclear receptors. *Protein Profile*, 2, 1173–1308.
- Hamza, M. S., Pott, S., Vega, V. B., Thomsen, J. S., Kandhadyar, G. S., Ng, P. W. P., et al. (2009). De-novo identification of PPARgamma/RXR binding sites and direct targets during adipogenesis. *PLoS One*, 4, e4907.
- Handoko, L., Xu, H., Li, G., Ngan, C. Y., Chew, E., Schnapp, M., et al. (2011). CTCF-mediated functional chromatin interactions in pluripotent cells. *Nature Genetics*, 43, 630–638.
- Haviv, E., Le Mevel, S., Morvan Dubois, G., Shi, D.-L., Scanlan, T. S., Demeneix, B. A., et al. (2006). Unliganded thyroid hormone receptor is essential for *Xenopus laevis* eye development. *The EMBO Journal*, 25, 4943–4951.

- Hawkins, R. D., Hon, G. C., & Ren, B. (2010). Next-generation genomics: An integrative approach. *Nature Reviews. Genetics*, 11, 476–486.
- Helssens, U. U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., et al. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 328, 633–636.
- Kawahara, A., Baker, B. S., & Tata, J. R. (1991). Developmental and regional expression of thyroid hormone receptor genes during *Xenopus* metamorphosis. *Development*, 112, 933–943.
- Kim, S.-I., Bresnick, E. H., & Bulman, S. J. (2009). BRG1 directly regulates nucleosome structure and chromatin looping of the alpha globin locus to activate transcription. *Nucleic Acids Research*, 37, 6019–6027.
- Klem, S., Strausberg, R., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S., & Richardson, P. (2002). Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Developmental Dynamics*, 225, 384–391.
- Labaj, P. P., Leparc, G. G., Linggi, B. E., Markille, L. M., Wiley, H. S., & Kreil, D. P. (2011). Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics*, 27, 1383–1391.
- Laudet, V. (2011). The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Current Biology*, 21, R726–R737.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11, 31–46.
- Nagaraj, S. H., Gasser, R. B., & Ranganathan, S. (2007). A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 8, 6–21.
- Nielsen, R., Pedersen, T. A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersback, R., Mergens, E., et al. (2008). Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes & Development*, 22, 2953–2967.
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., Klimke, W., & Maglott, D. R. (2009). NCBI reference sequences: Current status, policy and new initiatives. *Nucleic Acids Research*, 37, D32–D36.
- Ranjana, M., Wong, J., & Shi, Y. B. (1994). Transcriptional repression of *Xenopus* TR beta gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 24699–24705.
- Ruan, X., & Ruan, Y. (2011). Genome wide full-length transcript analysis using 5' and 3' paired-end-tag next generation sequencing (RNA-PET). *Methods in Molecular Biology*, 809, 535–562.
- Sachs, L., Danjanovski, S., Jones, P., Li, Q., Anano, T., Ueda, S., et al. (2000). Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 126, 199–211.
- Sachs, L. M., & Shi, Y. B. (2000). Targeted chromatin binding and histone acetylation in vivo by thyroid hormone receptor during amphibian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13138–13143.
- Salmonov, A. A., & Solovyev, V. V. (2000). Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Research*, 10, 516–522.
- Sandelin, A., & Wasserman, W. W. (2005). Prediction of nuclear hormone receptor response elements. *Molecular Endocrinology*, 19, 595–606.
- Santos, G. M. G., Fairall, L., & Schwabe, J. W. R. J. (2011). Negative regulation by nuclear receptors: A plethora of mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22, 87–93.
- Shoner, A., Mu, X. J., Greenbaum, D., Auerbach, R. K., & Gerstein, M. B. (2011). The real cost of sequencing: Higher than you think!. *Genome Biology*, 12, 125.

- Schiex, T., Moisan, A., & Rouzé, P. (2001). Lecture notes in computer science. In O. Gascuel & M.-F. Sagot (Eds.), Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Shi, Y.-B. (1999). *Amphibian metamorphosis: From morphology to molecular biology* (1st ed). Wiley-Liss, New York.
- Shi, Y. B., & Brown, D. D. (1993). The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 20312–20317.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., et al. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nature Genetics*, 38, 1348–1354.
- Tata, J. R. (1993). Gene expression during metamorphosis: An ideal model for post-embryonic development. *BioEssays*, 15, 239–248.
- Tymowska, J., & Fischberg, M. (1973). Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma*, 44, 335–342.
- Voigt, J., Chen, J., Gilchrist, M., Amaya, E., & Papalopulu, N. (2005). Expression cloning screening of a unique and full-length set of cDNA clones is an efficient method for identifying genes involved in *Xenopus* neurogenesis. *Mechanisms of Development*, 122, 289–306.
- Wang, Z., & Brown, D. D. (1991). A gene-expression screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 11505–11509.
- Wang, Z., & Brown, D. D. (1993). Thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 16270–16278.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews: Genetics*, 10, 57–63.
- Welboeren, W.-J., van Driel, M. A., Janssen-Megens, E. M., van Heeringen, S. J., Sweep, F. C., Span, P. N., et al. (2009). CHIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *The EMBO Journal*, 28, 1418–1428.
- Wickware, P. (2000). Next-generation biologists must straddle computation and biology. *Nature*, 404, 683–684.
- Wong, J., Shi, Y. B., & Wolffe, A. P. (1995). A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR beta A gene by the thyroid hormone receptor. *Genes & Development*, 9, 2696–2711.
- Yaoita, Y., & Brown, D. D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes & Development*, 4, 1917–1924.
- Yaoita, Y., Shi, Y., & Brown, D. D. (1990). *Xenopus laevis* alpha and beta thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7090–7094.
- Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Gündör, A., Mariano, P., Wang, S., et al. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nature Genetics*, 38, 1341–1347.
- Zimngli, R. A., Chan, J. S. M., & Aubin, J. E. (2008). Estrogen receptor-related receptor alpha (ERRalpha) regulates osteopontin expression through a non-canonical ERRalpha response element in a cell context-dependent manner. *Journal of Molecular Endocrinology*, 40, 61–73.

A- 3 Ré-assemblage et ré-annotation du génome de *X. tropicalis* pour l'analyse *in vivo* de ChIA-PET

Résumé

L'analyse fonctionnelle à l'échelle du génome nécessite l'annotation et l'assemblage à haute résolution de génomes. Nous avons utilisé la technologie ChIA-PET (analyse des interactions de la chromatine par séquençage de tags appariés, "chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing") pour analyser de réseaux de régulations de gènes, incluant les interactions tridimensionnelles des chromosomes qui sous-tendent la signalisation des HT (hormone thyroïdienne) chez l'amphibien *X. tropicalis* (*Xenopus tropicalis*). Cependant, les versions actuellement disponibles de l'annotation et de l'assemblage du génome de *X. tropicalis* n'ont pas la résolution requise par le ChIA-PET. Afin de surmonter ces obstacles, l'annotation et l'assemblage actuels ont été améliorés en utilisant les technologies de gPET (séquençage de tags appariés d'ADN génomique, "genomic DNA pair-end tag sequencing"), RNA-PET (séquençage de tags appariés d'ARN pleine longueur, "paired-end tags sequencing of full length RNA"). La grande taille (10 kb et 20 kb) des inserts utilisés pour le gPET ont permis non seulement l'amélioration de la qualité de l'assemblage, mais également la réduction de sa fragmentation, réduisant le nombre de "scaffolds" de près de 60 %.

Puis, le RNA-Seq (séquençage des ARN, "RNA sequencing") a été utilisé pour capturer les transcrits pleine longueur spécifiquement au niveau de leurs extrémités 5' et 3', définissant ainsi précisément les bornes des TSS (site d'initiation de la transcription, "transcription start site") et des TTS (site de terminaison de la transcription, "transcription terminaison site"). Ces modifications de l'assemblage et de l'annotation se sont révélées être des pré-requis essentiels à l'exploitation des données de ChIA-PET. Cette démonstration de l'application de la technologie ChIA-PET pour comprendre les régulations génétiques dans un contexte physiologique chez un organisme non-conventionnel pourrait fournir des éléments de guidage méthodologiques et conceptuels pour des approches similaires chez d'autres espèces dont les données en génomique sont de basse résolution.

Re-assembly and re-annotation of the *Xenopus tropicalis* genome for *in vivo* ChIA-PET analysis

Nicolas Buisine¹, Xiaolan Ruan², Patrice Bilesimo^{1,5,6}, Alexis Grimaldi¹, Gladys Alfama¹, Pramila Ariyaratne², Fabianus Mulawadi², Jieqi Chen², Wing Kim Sung², Edison Liu^{2,3}, Barbara A. Demeneix¹, Yijun Ruan^{2,3,4*}, Laurent M. Sachs^{1*}

¹ UMR CNRS 7221, Département Régulations, Développement et Diversité Moléculaire, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP32, 57 Rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.

² The Jackson Laboratory of Genomic Medicine, 263 Farmington Ave, Connecticut, USA and The Genome Institute of Singapore, 60 Biopolis Street, Singapore.

³ Department of Genetics and Developmental Biology, University of Connecticut, USA.

⁴ Genome Institute of Singapore, 60 Biopolis Street, Singapore.

⁵ Watchfrog S.A.S., 4 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France.

⁶ Ken and Ruth Davee Department of Neurology and Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University Feinberg School of Medicine Ward 10-332, 303 East Chicago Avenue, Chicago, Illinois 60611, USA.

Corresponding author: YR and LS

YR: The Jackson Laboratory of Genomic Medicine, 263 Farmington Ave, Connecticut, USA. Yijun.Ruan@jax.org

LS: "Function and action mechanisms of thyroid hormone receptors" group, UMR CNRS 7221, Département Régulations, Développement et Diversité Moléculaire, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP32, 7 Rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France. Phone: 33 (0)1 4079 3604, email: sachslm@mnhn.fr

Keywords: Thyroid hormone signaling, ChIA-PET, Paired end technology, genome assembly, genome annotation.

Abstract

Genome-wide functional analyses require high-resolution genome assembly and annotation. We applied ChIA-PET to analyze gene regulatory networks, including 3D chromosome interactions, underlying thyroid hormone (TH) signaling in the frog *Xenopus tropicalis*. However, the available versions of *Xenopus tropicalis* assembly and annotation did not have the resolution required for ChIA-PET, nor for physiological analysis. To overcome these limitations, the current genome assembly and annotations were improved using the paired end tag (PET) sequencing technologies and approaches (e.g., DNA-PET [gPET], RNA-PET and ChIA-PET etc.). The large insert (10 kb, 15 kb) paired end DNA-PET with high throughput NGS sequencing not only significantly improved genome assembly quality, but also strongly reduced genome "fragmentation", reducing total scaffold numbers by ~60%. Next, RNA-PET technology, originally designed and developed for full length coding and fusion mRNA in whole transcriptome studies (ENCODE consortia), was applied to capture full length transcripts specifically at the 5' and 3' ends, thereby defining TSS and TTS boundary sites and providing more accurate gene annotations at the genome-wide level. These amendments in assembly and annotation were essential prerequisites for the ChIA-PET analysis, enabling identification of complex regulatory configurations around TH-regulated genes and putative networks underlying physiological responses. This demonstration of the application of the ChIA-PET technology to understand physiological genetic regulations in a less-conventional model could provide valuable conceptual and methodological guidance for similar approaches on other species with low-resolution genome data.

Introduction

The rapid advances and reduced costs of sequencing are increasing the number of genomes available for study (Mardis, 2011). However, functional post-genomic analyses require high quality genome assembly and annotation, and such levels have only been achieved for a few reference genomes including human, mouse, *Drosophila* and yeast. Initial genome assembly and annotation is labor-intensive, implicating sustained computation and manual curation efforts that will most often be incomplete. Regular curation and updating are required to ensure high standards in reference genome quality in current public databases (Reese et al., 2000, The ENCODE Project Consortium, Graveley et al., 2011, Hoskins et al., 2007, Lin et al., 2007, The modENCODE Consortium). In contrast, most newly completed genome projects targeting *de novo* assembly, produce draft genome assemblies and annotations with tens, or even hundreds of thousands of fragmented scaffolds, numerous gaps and sequencing errors (see for example Varshney et al., 2013, Bombarely et al., 2012, Li et al., 2009). Although these assemblies, together with genome annotation, provide some estimation of the gene repertoire, they carry little information on the medium/large scale structure of the genome. Too often, the quality of draft genomes is a major limiting when trying to exploit maximally data from recent advances in functional genomics. Alternative strategies and approaches are needed to improve assembly and annotation (Huang et al., 2013, Eckalbar et al., 2013, Zhuo et al., 2012 for a few examples). Current advances in high throughput sequencing of genomic DNA and RNAs offer complementary technologies to re-annotate genomes and to use these high-resolution tools to shed new light on our perception of physiological and biological processes in non conventional models.

In all chordates, post-embryonic development involves a complex set of molecular, cellular and anatomical transitions, which are orchestrated by thyroid hormones (TH) signaling (Tata, 2006, Laudet, 2011). The anatomical changes are often dramatic, as it is well illustrated in the case of flatfish and amphibian metamorphosis. In precocial birds, such as chicks, this transition corresponds to the hatching period. In mammals it is often equated to the perinatal period, for which the

transition phenotype is anatomically subtler, but the changes in respiration, nutrition and sensory nervous system maturation are well marked. THs triggers complex transcriptional remodeling programs affecting cell fate by inducing a variety of transcriptional programs in different tissues/cell types, for instance apoptosis/cell death versus cell growth/proliferation. These programs often occur simultaneously in different cells within given organs or tissues. Thus, because of these cell specific responses, it is difficult to design experimental approaches to characterize the transcriptional programs underlying the responses, particularly in *in vivo* settings. To tackle this biological question and challenge, we use metamorphosis in *Xenopus (Silurana) tropicalis* (X. *tropicalis*) as a working model. Amphibian metamorphosis is the most marked of the developmentally TH-dependent post-embryonic transitions described above. During anuran (frogs and toads) metamorphosis an aquatic tadpole changes to an air-breathing frog, with almost all tissues undergoing profound remodeling (Shi, 1999, Tata, 1993). A key feature of amphibian metamorphosis is that external organs can display opposite fates: the tadpole tail regresses and ultimately disappears whilst limbs grow *de novo* from limb buds. Amphibian metamorphosis is thus an attractive model to study the impacts of THs on transcriptional reprogramming during post-embryonic development in vertebrates. As in other organisms, THs signaling is mediated by nuclear receptors (TR) affecting the transcriptional state of target genes (Grimaldi et al., 2013). Our overall aim is to determine the repertoire of TR mediated direct and indirect TH target genes and the characterization of TR-based regulatory networks.

Deriving a full repertoire of a transcription factor binding sites (TFBS), such as TR, can usually be achieved with a target-specific ChIP-Seq experiment, in which the DNA sequences bound to an affinity-purified transcription factor are sequenced (Furey, 2012). The problem of genome wide profile maps is that TFBS are often located far away (>200 kb) from their cognate gene, and can even be located within another gene. Indeed, enhancers located far from their target genes functionally and physically interact with the transcriptional machinery at the target gene through DNA looping (Sanyal et al. 2012). As a result, it is misleading to relate each TFBS to a given target gene solely based on genomic proximity. In addition, TFBS can also be arranged into *cis* regulatory modules controlling the transcriptional status of several target genes at once, which may further complicate the assignment of a

TFBS to its target genes (Li et al. 2012). In order to circumvent these problems, we used ChIA-PET technology to identify TR binding sites across the whole genome in a manner similar to obtaining ChIP-Seq binding site information, but also revealing their physical interactions with distant genomic sites (Fullwood et al. 2009a, Fullwood et al. 2009b). This approach ensures identification of the gene sets directly regulated by TR-mediated signaling. Crucially, successful ChIA-PET analysis relies on high quality genome assembly and annotations, as “fragmented” assemblies lower the resolution of large-scale interaction maps. In addition, poor gene annotation, especially at 5' ends, would tend to associate transcriptional regulators to regions located outside of genes and limit the identification of direct target genes. Unfortunately, during the initial course of the ChIA-PET analysis of the TR transcriptional network for *X. tropicalis* metamorphosis, it became clear that the state of the genome assembly and annotation was the bottleneck of the analysis, as the resolution was too low to resolve accurate ChIA-PET locus assignment.

Here, we describe the technological framework used to improve annotation and re-scaffold the genome assembly of *X. tropicalis*. This genome is also an ideal test case because the genome size (~1.5 Gb) is smaller than mammalian genomes, and the draft assembly, although “fragmented” (Hellsten et al. 2010, ~ 20,000 scaffolds) is much less so than others (e.g. fish *Platypus lavareti* with ~350,000 scaffolds, Warren et al., 2008, or, Panda *Ailuropoda melanoleuca* with >500,000 scaffolds, Li et al., 2010). We used large insert DNA-PET and full-length RNA-PET (in a combination with paired end RNA-Seq) to define boundaries of genome-wide transcripts using NGS sequencing. This combined approach allows accurate capture of 5' and 3' transcript ends and variants, in a length-independent manner. The method(s) are remarkably powerful for improving gene annotation, permitting detection of transcripts and unambiguously identifying gene boundaries, alternative transcripts, transcript start sites (TSS) and termination sites (TTS) etc. We also used the connectivity information provided by the large insert DNA-PET to bridge “un-assembled scaffolds” in the published assembly. This combined effort dramatically reduced the total scaffolds in the genome assembly, corrected and improved the published version and enabled ChIA-PET analysis.

RESULTS

Large insert DNA-PET significantly reduced complexity of genome assembly.

Our starting point was the published *X. tropicalis* genome assembly (v4.1). It is composed of 19,759 scaffolds, with the top ~ 2000 scaffolds (longer than 20kb) covering 80% of the assembly (~ 1.5Gb) (Hellsten et al. 2010). The average scaffolds size is about 76kb, which is smaller than the average gene length (~ 28kb) and would be a limitation if one wants to address physical interactions across several genes (Buisine and Sachs, 2009). The vast majority of these scaffolds are not fully sequenced, leaving numerous, often large, assembly gaps (Figure 1A). The scaffolds can be classified into three main groups: 1) numerous small “scaffolds”, composing ~30% of the total scaffolds, ~1.4% of the total sequence, actually have the size of Sanger sequencing reads or short contigs (up to 5kb); 2) a collection of relative larger scaffolds (15kb to 50kb) have average sizes consistent with that obtained from cosmid clones. Given that they comprise large assembly gaps, they are more likely derived from sequences originating from cosmid inserts. Finally, 3) the largest collection of scaffolds (> 100kb), that are most likely assembled from BAC clone sequences. The quality of this assembly is very similar to that of other draft assemblies (supplementary data in Buisine and Sachs, 2009). Of note, among the 183,010 assembly gaps present in the current published sequence, 84,126 (45.9%) are exactly 50bp long, which probably reflects a technical issue of the assembly process. Such systematic bias suggests that the real size of these “50bp gaps” is unknown and was set by default at this value.

DNA-PET technology was used to improve this assembly. This technology was initially applied to cancer research (Ruan et al., 2007) and more recently genome assembly (Yao et al. 2012). The method sequences both ends of size-defined large (e.g., 10kb or 15kb) DNA fragments, which are then mapped to the reference genome (Supplementary Figure 1). The approach provides important connectivity information over large genomic regions, which is often critical for genome assembly. The sequenced reads composed of two kinds of PETs: “concordant” PETs (cPETs), for which the two tags are mapped onto the same scaffold at the given distance corresponding to the size of the DNA fragments; and “discordant” PETs (dPETs),

for which the two tags mapped onto different scaffolds. cPETs can be used to assess the quality of the datasets, estimate the number of assembly errors, the real size of assembled gaps of unknown length ("50bp gaps", see below) and possible structural variations. dPETs can also be used to improve the assembly of the scaffolding. Two large insert DNA-PET libraries (10kb and 17kb) were created using kidney and liver genomic DNA. A summary of the DNA-PET statistical data is shown in Figure 1B. A total of 77.8 million uniquely mapped PETs were obtained for further mapping and downstream analysis.

The average insert size (mapped distance between two tags), estimated by measuring the mean genome span of cPETs, was 9.6kb and 17.5kb for the two libraries IXT010 and IXT011, respectively. This agrees well with the expected size (Supplementary Figure 2A) and validates library quality. As expected, concordant PETs composed the vast majority of the dataset and dPETs accounted for 8 to 10 % of the total PETs (Figure 1B), consistent with what is usually found in most DNA-PET datasets. In addition, genome-wide cPET coverage profiles were computed from each library by counting the number of cPETs in sliding 20kb windows. They are highly correlated ($r=0.97$, Supplementary Figure 2B), thus showing the high quality and reproducibility of the datasets.

We first used the cPET datasets to estimate the size of the numerous "50bp gaps". To this end, we selected the cPETs spanning a single gap of exactly 50bp and computed the average difference between the expected (9.6 or 17.5kb) and the observed genome span of individual PETs. Positive values of this estimate indicate that the minimal region delineated by the cPETs is actually much longer than expected, presumably (but not only) because of the uncertainty attributed to the gap length. Negative values, meaning that the minimal region is actually shorter than expected, may result from structural polymorphism between our sequenced strain and the reference genome sequence. We found that more than half (46,249) of the "50bp gaps" out of (84,126) have an actual average size of ~500bp long (Supplementary Figure 3). This increases the total size of the assembly by an extra 12.7Mb. In a typical case, the genome span of cPETs follows a bell shape distribution (see Supplementary Figure 4 for a few illustrative examples). Interestingly, we also spotted a number of cases (~ 8%) where the genome span distribution of cPETs was bimodal, of which one, or both gap length estimates

deviated significantly from expectation (Supplementary Figure 5). A similar procedure was used for assembly gaps of other sizes, of which a few examples of mono and bi-modal distributions are shown (Supplementary Figures 6 and 7). Altogether, the analysis increased the assembly size together by ~ 21.8Mb in total. Simultaneously, our analysis also re-calculated the size of assembly gaps, since this can have a significant impact in estimates of the genomic distances between structural and/or functional elements. Furthermore, 50bp long features can be difficult to see on genome browsers and may be visually missed by biologists.

In a number of cases, the cPET coverage drops to zero, meaning that the left and right hand sides of the breakpoint are not connected together at the resolution of the average DNA-PET insert size (~10kb and ~17kb). These assembly breakpoints can either result from structural polymorphisms between reference and sampled genomic DNA, or from various *scenarii* of mis-assembly errors (e.g. the left and right hand sides of the breakpoints are each connected to a different scaffold, or the "50bp assembly gap" actually correspond to a region much longer than ~20kb). Two examples are illustrated in Supplementary Figure 8. In both cases, cPET coverage drops to zero at a 50bp assembly gap. Note that by definition, the length of these 50bp gaps cannot be estimated based on the average cPET span. Interestingly, the breakpoints are flanked by one or two clusters of discordant PETs pointing to different scaffolds, strongly suggesting that based on our sequenced DNA sample, the left and right sides of the breakpoints are each connected to a different scaffold. Overall, we identified a total of 352 cPET coverage breakpoints, of which, 211 were re-connected to other scaffolds during the re-scaffolding process (see below).

We then used dPETs to improve the physical contiguity of the scaffolds and to better describe the large-scale structure of the *X. tropicalis* genome. As a first step, and given the number of large assembly gaps that are susceptible to accommodate smaller scaffolds, scaffolds were split at gaps larger than 10kb. This corresponded to 1031 locations. We also split scaffolds at cPETs coverage breakpoints (see above). The two datasets were then combined and processed with the PE-Assembler software (unpublished method), which was previously shown to perform well (see methods, Earl et al. 2011). The statistics of the improved assembly are shown in Figure 1C. The total number of scaffolds is reduced by 56%,

the N50 and the size of the largest scaffold increases by ~3 folds (2.8 x and 3.5 x, respectively). A total of 4901 short contigs (~ 2-3kb "scaffolds") could not be connected to other scaffolds. These originate from small contigs which are too short to be assembled because given the insert size of our DNA-PET libraries (> 9.6kb), two contiguous short scaffolds may not be directly connected by dPETs and would fail to assemble into longer chains. The remaining scaffolds could be associated into longer chains, of which 1283 are composed of 5 scaffolds or more.

In order to visualize the improvements, we plotted for each scaffold the relationship between its size in bp (in log scale) and the percent of its sequence remaining to be determined (Figure 1D) and compared the result with the same representation of the published assembly (Figure 1A). Scaffolds located in the uppermost part of the plot correspond to scaffolds containing numerous or large assembly gaps. In contrast, scaffolds located at the lowermost part of the plot contain few, if any. Ideally, assembled scaffolds sequenced to completion, and ultimately chromosomes, should be located at the lower right side of the plot. Re-scaffolding with DNA-PET clearly shifts the distribution of the scaffolds corresponding to 80% of the sequence assembly (pink rectangle, Figure 1A) from 1Mb to towards to right hand side of the plot (Figure 1D).

Re-scaffolding with dPETs connected 26,703 scaffolds into 3594 "chains" of various length, of which the frequency distribution is shown Figure 1E. The longest chain is composed of 519 scaffolds with an average chain length of 3.14 (median = 1). Although this may suggest that the re-scaffolding efficiency is rather low, finally, only a minority of scaffolds (4901, ~ 18%) were not linked to another scaffold. When discarding these short "scaffolds", the average chain length raises up to 5.12 (median = 3). In addition, smaller scaffolds filled 835 assembly gaps. An example of re-scaffolding is shown Figure 1F. The two libraries, built with different insert sizes, provided similar results, although the PET count of the edges originating from the 17kb library tends to be higher than that from that of the 9.6kb library. Two scaffolds containing large assembly gaps (105kb in scaffolds_481 and 5 kb in scaffold_409), which were split in two before re-scaffolding, were effectively re-connected. Overall, the estimated link size between two scaffolds varies from < 1 to ~ 10kb. In a number of cases, with link size < 6 kb, we could validate the link by conventional long-range PCR (data not shown).

Connectivity between scaffolds can be represented by direct acyclic graphs (Supplementary Figures 9-11), where vertices correspond to scaffolds (drawn as ovals) and dPET links to edges. In these figures, vertices are labeled with the scaffold name, size and its original position in the scaffold, before the splitting at assembly gaps and assembly errors. With this representation, bubble-like structures correspond to small scaffolds inserted into larger ones. They can also result from the complex the connectivity between tandemly arranged short scaffolds, or a combination thereof. Note that bubble-like structures are common but bifurcating forks are rare, meaning that there are only a few unresolved connections. This result further illustrates the strength of our dataset. A number of long scaffold chains, long-range connectivity and bubble-like structures are shown in Supplementary Figures 9, 10 and 11. Detailed examples of assembly gaps filled-in by small scaffolds are shown in Supplementary Figures 12, 13 and 14.

In summary, in this section we show that DNA-PET helps improve genome assembly by constructing large chains composed of connected scaffolds that enable one to identify and correct assembly errors. From here on, our results are based on the assembly v4.1 after re-scaffolding.

Genome re-annotation with RNA-PET and RNA-Seq.

Gene annotation is a complex process relying on high quality experimental resources and dedicated computational tools. The transcriptional start site is an important functional feature, which is usually difficult to annotate, especially with conventional RNA-Seq, or EST mapping. Here, we used a combination of paired end RNA-Seq (PE-RNA-Seq), conventional RNA-Seq and RNA-PET datasets to re-annotate the *X. tropicalis* gene content.

PE-RNA-Seq based transcript assembly and mapping were carried out following a standard procedure with TOPHAT (Trapnell et al., 2009) and CUFFLINKS (Trapnell et al., 2010). The resulting models were then combined with RNA-PET data. RNA-PET was initially a technology designed for detecting transcripts resulting from gene fusion in cancer cells (Ruan et al., 2007) and recently used to derive a *de novo* annotation of the sweet orange genome (Xu et al., 2012). RNA-PET demarcates specifically both 5' and 3' ends (27bp each) of all

expressed full length RNA molecules, which include normal and splice variants, truncated isoforms, fusion transcripts etc. that might be derived from various conditions. The protocol used is a modified version (Ruan & Ruan, 2012) of the original method described as "GIS-PET" (Ruan et al., 2007). This process is summarized in supplementary Figure 15.

A total of seven RNA-PET libraries were constructed using RNAs isolated from two larval tissues (i.e. premetamorphic stage NF54 tadpole tailfin and limb buds), and five adult tissues (i.e. brain, kidney, liver, muscle and intestine). After paired end sequencing at 2 x 36bp, the 3' end tag of the transcript, specifically recognized by a signature sequence "AACTGCTG" (Ruan and Ruan, 2012), was identified through a modified Smith and Waterman (SW) algorithm. Practically, each paired end sequence read (2 x 36bp) was screened first for the 3'-specific "signature" sequence, and labeled as HT (Head and Tail) if one end had found the "signature", labeled TT (Tail Tail) if both ends had the "signature" (noise), or HH (Head Head) if neither end had the "signature" (noise). For each library, between 60% to 75% of PET sequences had HT sequences, indicating that the majority of the captured PETs represent full-length transcripts (Supplementary Figure 16). Approximately 20% to 40% PET sequences are noisy HH products largely due to sequencing errors in the 'T' signature. We noted, however, that relaxing the SW algorithm parameters (i.e. lowering the alignment mismatch threshold) failed to rescue more HT PETs from the HH pool. Thus, this minor artifact is a direct consequence of searching a short (8bp) signature sequence, which cannot tolerate more than two bp mismatches. Subsequent analysis was carried out only using the desired HT (5'- and 3'-tag) sequence reads.

All libraries provided quality results, except the liver library that produced a limited number of PETs, which probably resulted from a library of lower quality. In order to address possible sequencing bias, we also built three libraries (from intestine, kidney, liver) for sequencing on a SOLiD platform. Note that due to the SOLiD sequencing chemistry limits, the 5' and the 3' end of transcripts cannot be distinguished and thus this data can only provide transcript boundaries, irrespective of the transcription orientation. However, the coverage of the transcription units with transcripts models between the two sequencing platforms was highly correlated $r=0.867$, illustrating that the RNA-PET based transcript models have little bias from

different sequencing platforms.

PET clustering was carried out independently for each library with two sets of parameters (see Methods). The set of parameters is quite stringent and is less sensitive to noise at the cost of producing shorter clusters. The relaxed set of parameters tends to produce longer models, but may merge together a few overlapping clusters. The two resulting datasets were then merged and filtered out by selecting independently for each transcription unit the longest model without over-clustering. This "promotion" step adapts the stringency of the clustering parameters defined by the local context. Clusters were subsequently coalesced in order to derive gene new models.

In order to characterize the noise originating from unspecific ligation events, we plotted for each library the frequency of each cluster as a function of its size (in bp, with a logarithmic scale, see Supplementary Figures 17-23). It is reasonable to assume that background noise would be associated with clusters with a low PET count, whereas PET count would be more robust for clusters derived from highly expressed genes in the tissue. In all PET libraries, the frequency of cluster size followed a bimodal distribution, with a sharp drop at 3.3 (~ 2Kb). When only clusters with increasing PET count were taken into account, the first peak progressively disappeared, indicating that cluster span smaller than 2Kb were associated with low PET count noise and were discarded. Putative transcript models were further filtered out if they were not supported by at least 2 reads per kb, based on strand-specific conventional RNA-Seq carried out from the same RNA samples (see Methods). On average, PETs could be clustered into 712,817 clusters (Supplementary Figure 24) that may correspond to as many alternative transcripts. Putative transcript models were further coalesced and were assigned as 17,993 distinct genes (or transcripts).

Overall, the RNA-PET and RNA-Seq identified 12,387 expressed genes already annotated in the Ensembl database from the tissues tested. A total of 4,729 genes described in Ensembl were not expressed, probably representing exclusion from these tissues at the developmental stages examined. Moreover, we also identified 5,607 previously un-annotated transcription units. Approximately 80% of the RNA-Seq reads were located within the boundaries of the new models (Figure 2A). In contrast, around ~ 63% of RNA-Seq reads overlap with Ensembl gene models,

indicating that improvement in description/annotation is required for the existing assembly on gene and transcription units. Moreover, Ensembl models specifically capture only a marginal fraction of RNA-Seq reads, suggesting that only a fraction of transcribed units may be missed or that missed genes have low expression levels. Altogether, these results showed that gene re-annotation, based on the tissue RNA sequenced, significantly improved transcript annotation. In order to further characterize the improvement of gene annotation, we plotted the density of RNA-Seq reads and the RNA-PET coverage over the normalized length of Ensembl gene models, together with 10kb upstream and downstream (see Methods, Supplementary Figure 25). RNA-Seq reads are mostly found within gene bodies, although a significant fraction of them extends beyond the gene boundaries into the 5' and 3' flanking regions. The reciprocal plot showing that the new annotation encompasses most Ensembl genes and efficiently captured RNA-Seq reads confirms this result.

Moreover, our new models are significantly longer than Ensembl gene models (average 34,306bp vs 27,688bp). We found 58% of Ensembl genes to be significantly longer ($> \times 1.3$ or $> 5\text{kb}$) once re-annotated. In order to further illustrate this point, we plotted individual gene length based on the Ensembl versus the improved annotations (Figure 2B, Supplementary Figure 26). Importantly, it was noted that RNA-PET could also capture the 5' end of 938 genes, which were missed with PE-RNA-Seq, which further illustrates the value of RNA-PET for precisely demarcate gene boundaries. Overall, our RNA-PET data detected a total of 187,396 alternative TSS. A few illustrative examples of improvement are shown in Figure 3 (A to C). The *cadm2* gene is an extreme case (3B), for which the Ensembl gene model is 210kb long, but the RNA-PET model extends the gene boundaries by an extra ~730kb. The resulting new gene model, strongly supported by RNA-Seq data, is ~940kb long. This result illustrates the value of RNA-PET in improving annotation by accurately demarcating gene boundaries. Gene size can indeed vary over several order of magnitudes whereas transcript size, which is ultimately measured by RNA-PET, is much shorter, more homogeneous and thus, easier to capture. To confirm that RNA-PET efficiently captures transcripts ends, we relied on the fact that the 5' and 3' ends of transcribed genes is RNA Pol II enriched (Adelman and Lis, 2012) and carried out a chromatin immuno-precipitation (ChIP)

with an anti-RNA Pol-II antibody. RNA Pol-II ChIP was followed by deep sequencing (ChIP-Seq), and derivation of genome-wide density profiles. As shown in Figure 2C, RNA Pol II is strongly enriched at 5' and 3' ends of RNA-PET models. Furthermore, the RNA-Pol II peak at the 5' end of genes is 31bp offset relative to the transcriptional start site defined by RNA-PET based models (Figure 2C). This result is consistent with previous observations where genome wide profiling showed that RNA Pol II density peaks between 25 to 45bp downstream from the TSS (Zhou *et al.* 2012). In the case of the Ensembl gene models, the RNA Pol II profiles are also enriched at their 5' and 3' ends, but to a much lesser extent and the offset, relative to the gene model start, is much lower ($< 10\text{bp}$, Supplementary Figure 27). Given that RNA Pol II elongation pauses at a checkpoint located ~40bp downstream of the TSS, these results strongly support the view that RNA-PET helps capture the 5' end of genes more precisely and thus helps to improve gene annotation.

Interestingly, an additional ~ 800 RNA-PET models, well supported by RNA-Seq, were found to overlap two scaffolds, reflecting the fragmented state of the assembly. In most cases (~ 80%), however, the two scaffolds actually belonged to the same hyper-scaffold, as they were linked together by clusters of discordant DNA-PETs (Figure 3D). These examples cross-validated the DNA-PET and RNA-PET dataset consistency.

Altogether, these results clearly showed that 1). RNA-PET based gene models are strongly supported by RNA-Seq and RNA Pol II ChIP-Seq data, and 2). Existing gene models are extensively improved.

Benefit of DNA-PET and RNA-PET for ChIA-PET analysis.

Our overall aim at the outset of this work was to apply ChIA-PET analysis of TR binding to increase knowledge of the gene networks controlling metamorphosis. The details of the experimental procedure and the full datasets generated by this method applied to *X. tropicalis* will be published elsewhere. Here we selected salient statistics and examples to illustrate the benefit of the re-annotation process facilitated by RNA-PET, combined with the deeper analysis achieved by DNA-PET.

An initial analysis based on Ensembl models and our preliminary ChIA-PET

datasets, revealed that the 5' ends of 21 genes displayed long-range interactions. Applying our improved annotation significantly improved the resolution of this ChIA-PET analysis, increasing the number of genes with long range interactions to 175. DNA-PET had a lower impact; with the rescue of 31 TR binding sites engaging discordant long-range interactions (*i.e.* connected to a functional element located on another scaffold).

The benefit of improving genome annotation with RNA-PET, *per se*, is best illustrated with the *bcl6* gene, the boundaries of which have been significantly extended with RNA-PET (Figure 4). This gene is strongly induced by T₃ (~ 4 fold) and there is a TR binding site (BS1) located nearby (~ 65kb upstream, Figure 4). Three other TR binding sites (BS2, BS3 and BS4) are located much further downstream, 152kb and 485kb (BS2 and BS3 are separated by ~600 bp). The binding sites BS2 and BS3 are located at the 3' end of a gene newly annotated by RNA-PET (not regulated by T₃). Thus, based on the Ensembl annotation and ChIP-Seq-like data alone (e.g. the ChIP-Seq component of ChIA-PET), one would infer that *bcl6* transcription would be under the control of the TR bound at BS1. Interestingly, the binding sites BS2, BS3 and BS4 are connected by interaction PETs, suggesting that they physically interact with each other through DNA looping (Figure 4A). They are also connected to the 5' end of the new *bcl6* gene model, but not the Ensembl gene model. The site BS1 does not engage long-range interactions. Therefore, with this information one infers that *bcl6* transcription would be under the control of the TR bound at BS2, BS3 and BS4, and not BS1 as initially assumed. This result is confirmed by conventional ChIP-qPCR where TR binding at BS2, BS3 and BS4 is strongly induced upon induction with T₃, but not BS1 (Figure 4B and 4C). TR binding is also enriched at the newly annotated *bcl6* TSS, to a weaker but significant ($p=0.044$) extent. In addition to *bcl6*, the transcripts level of the *lpp* gene is also significantly increased upon treatment ($p=0.044$, Figure 4D). Conversely, the transcription of *trpg1* is not affected by T₃ treatment. A model of *bcl6* locus long-range interactions through DNA looping is shown in Figure 4E.

Another example of the crucial input from RNA-PET re-annotation for ChIA-PET analysis is shown in Figure 5. A novel gene was detected by RNA-PET, this gene not showing up in the Ensembl track (Figure 5A, top three tracks). The transcription of this novel gene is strongly induced upon T₃ treatment (~ 50 fold, Figure 5A,

bottom tracks). ChIA-PET analysis revealed that a strong TR binding site is located precisely at the TSS. These results were further confirmed by RT-qPCR and conventional ChIP-qPCR (Figure 5B and 5C).

Altogether, these results illustrated that accurate gene annotation and re-scaffolding are critical prerequisites for ChIA-PET analysis. This may not be an issue for genome analysis of model species, but the lack of accuracy of an assembly is a severe limitation for post-genome functional studies in non-conventional models. In this respect, combinational analysis with RNA-PET and DNA-PET proved to be a reasonably efficient way to improve gene annotation and genome assembly.

Discussion

To better understand the molecular mechanisms controlling onset of specific transcriptional programs during metamorphosis we carried out an *in vivo* ChIA-PET analysis of TR binding sites in the *X. tropicalis* genome. ChIA-PET offers a key advantage over conventional ChIP-Seq analysis in that it simultaneously provides the equivalent of both ChIP-Seq plus 3C/4C analyses together. It thus accelerates and optimizes identification of direct target genes. However, ChIA-PET and conventional functional genomic technologies require high-resolution genome annotation. Given that a sufficiently precise annotation of the *X. tropicalis* was not available we had to improve genome assembly and gene annotation to exploit ChIA-PET analysis. The principal finding emerging from this work is the benefit of using PET technologies for improvement of genomic resources for non-conventional models.

PET technology: a powerful way to advance genome assembly and annotation

Sequencing technologies have dramatically improved over the past few years, increasing sequencing depth and reducing cost. The benefits of the PET technology, in improving genome assembly and annotation, are not limited to ChIA-PET analysis, but also extend to many aspects of genome analysis for which

the quality of genome assembly and annotation have proved critical for genomic and post-genomic research. PET technology overcomes some of the difficulties encountered when improving existing assemblies and annotations (Yandel and Daniel, 2012). Although many tools exist, it usually requires to re-run complex annotation and assembly pipelines. PET technology provides a quick and easy way around this since the PET data can be used in a simple post-processing step to extend existing gene models and does not require extensive human and bioinformatic resources. A similar pipeline can be applied to the many existing (and future) draft genome assemblies for which gene annotations can be quickly improved. These technologies can also be included in the analysis pipelines used to generate *de novo* genome assemblies and gene/transcripts annotations. The description of genomic features can thus improve quickly and will benefit in turn from full power of high-resolution functional genomics, in describing the molecular mechanisms of phenotypic, genetic and epigenetic diversity. Scientists working on conventional models may also be interested in monitoring the level of genomic divergence between the reference genome sequence and that of the cell lines/strains/individuals they are working with. They might also want to annotate the transcripts of specific tissues or cell types poorly represented in databases. Importantly, DNA-PET and RNA-PET is fairly cost-effective and do not require the combined workforce of several research institutes. This could be instrumental to bring genome projects within reach of small research communities.

X. *tropicalis* genome assembly

DNA-PET allowed us to improve the published *X. tropicalis* genome assembly, reducing fragmentation by half, allowing estimation of gap size and the correction of several mis-assemblies. During the course of this work, a new version of the assembly was released (v7.1), with the inclusion of a *X. tropicalis* genetic map. This assembly reaches chromosome-level scaffolding (Wells et al., 2011). We note, however, that although 80 % of the assembly corresponds to only 8 scaffolds, the total number of scaffolds remains large (7730) with many small scaffolds (1518 between 10 and 200kb, and 6039 < 10kb), suggesting that many smaller-scale

connections are left unresolved. Indeed, a large number of assembly gaps are exactly 100bp (17933 out of 44685, 40%) or 10kb (1200, ~3%) and may integrate smaller scaffolds in a manner very similar to the results presented above. In addition, based on our DNA-PET data, we found numerous (6479) assembly breakpoints together with a large number of genomic inversions (1845) of various sizes (3 to 74kb, median 16kb, with a vast majority at 10, 20 or 40kb). This illustrates that despite an apparent better assembly at the chromosome level, this assembly suffers from numerous smaller scale errors that can be easily identified and corrected with our DNA-PET datasets. Given that this level of fragmentation (breakpoints + inversions) surpasses that of version 4.1, we based our work on version 4.1.

The improvement of genome assembly, by increasing the average scaffold size up to ~ 4Mb with DNA-PET, proved less critical in our case to address ChIA-PET analysis, since the total number of rescued long range interactions is fairly low. Although this may not be true for all genomes/DNA-bound proteins, physical connections among genes and regulatory elements tend to occur in genomic domains spanning tens of kb up to a few Mb (Gibcus and Dekker, 2013). Very recent work suggests that this may indeed be a general feature of transcription factors connectivity networks (Sanayal et al, 2012). Thus, the fact that DNA-PET rescues a limited number of long-range interactions between functional elements may rather reflect an intrinsic property of the TR connectivity network instead of a failure of DNA-PET to rescue existing long-range interactions.

Nevertheless, in the near future, the data provided here when integrated with versions 4.1 and 7.1 of the genome will allow the *Xenopus* community to release a more comprehensive assembly.

X. *tropicalis* genome annotation

We used an original method to improve the gene annotation of the *X. tropicalis* genome. Indeed, RNA-PET was initially designed (Ruan et al. 2007) to discover novel fusion transcripts in cancer cells and used in combination with DNA-PET analysis to detect various genome rearrangements and structural variations (such

as bicistronic transcripts, translicing transcripts, translocation generated transcripts, deletion, insertion, tandem replication-derived transcripts). This application relies on the assumption that gene annotation is accurate and comprehensive, which is the case for human and mouse genomes. Here, we applied it in a reverse manner, to re-annotate a genome and re-define gene models, and allowing detection of novel genes.

By capturing the 5' and 3' end of full-length transcripts, RNA-PET provides direct evidence for locating TSSs and TTSs. This feature was instrumental for re-defining boundaries of gene models. Indeed, transcribed genomic regions (exons) are easily identified with conventional RNA-Seq. However, without additional information, it is difficult to connect (or not) intergenic RNA-Seq signal to nearby gene. This is well illustrated in the case of a transcribed region located just upstream of a given gene model. Without additional information, it is difficult to tell whether this is a novel gene or whether this corresponds to a first exon, or that the nearby gene model should be extended. By delineating transcript boundaries, RNA-PET unambiguously solves this issue and defines cognate promoter regions. This point is crucial since most functional genomic studies focus on transcription regulation, which relies heavily on accurate and comprehensive annotation of TSSs and flanking sequences (promoter regions). Indeed, we found that the re-definition of gene boundaries with RNA-PET is a prerequisite for our analysis of ChIA-PET data. The ChIA-PET thus permits quantitative definition of physical interactions of TR with the basal transcription machinery which can show up as direct interactions between the regulator and RNA Pol II bound at the 5' end of genes, thus unambiguously identifying direct target genes. Importantly, as these physical and remote interaction sites can span over large genomic distances (> 200kb), our results illustrate the exquisite resolution capacity of ChIA-PET in identifying transcriptional regulators even when spread over large genomic regions and at large distances from their target gene. By clearly identifying the TSS and promoter regions, this new annotation resource may also be highly relevant for people working on transcriptional regulation in *Xenopus*.

Of note, although RNA-PET does not provide information relative to the internal structure of transcripts, it nonetheless helps discriminate between alternative transcripts, which can share their 5' (or 3') end but not their 3' (or 5') end. Transcript

reconstruction with paired-end RNA-Seq data helps document their internal structure, but is not guaranteed to capture the 5' end of transcripts. Paired end RNA-Seq has nonetheless the advantage of being less demanding in terms of sample quantity and library construction. Thus, even when extensive RNA-Seq (conventional or paired-end followed by transcript assembly) data are available, RNA-PET is a precious complement. In addition to improve the definition of annotated genes, we could also detect numerous RNA-PET models (5' and 3' ends of transcripts) split over two scaffolds, illustrating further benefit of using RNA-PET to correct and improve the existing assembly and gene annotations.

In summary, this work provides a set of biological resources, RNA-PET libraries providing better demarcation of genes, a list of alternative transcriptional start sites, promoter regions together with two large insert DNA-PET libraries (9 kb and 17 bp) helping re-assemble the published genome and providing the location of structural polymorphisms. The workflow presented demonstrates how these resources can be exploited by the scientific community for functional, structural and evolutionary analysis of genomes in non-conventional models.

Materials and Methods

Animals and treatments

Adult *X. tropicalis* frogs were obtained from NASCO (Fort Atkinson, WI) and maintained at 24°C in aquatic housing system (MPAquarien, Rockenhausen, Germany). Mating was induced by injection of 200U of human chorionic gonadotropine for females and 100U for males (Chorulon; Intervet, Beaucouze, France). Tadpoles were raised at 26°C. Tadpoles were staged according to the normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) of Nieuwkoop and Faber (NF) (1967). For this treatment, tadpoles at stage NF54 were exposed 24 h, in 5 liters with 10 nM T₃ (ref. T2752; Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Tadpoles were killed by decapitation after anesthesia (ref. E10505; 0.01% MS222, Sigma) before hindlimb and tail fin dissection. Animal care was in accordance with institutional and national guidelines. Ethical approval for animal experimentation has been issued for this

research project (ref: 68008, delivered by the Cuvier Ethic Committee).

RNA isolation

For each physiological condition, tissues were isolated from groups of 10 tadpoles, collected, flash frozen, and stored at -80°C. Tissue lysis was performed in 500 µl of RNABle (ref: Gex-ex-T00 – 0U; Eurobio, Les Ulis, France) with one bead (INOX AISI 304 grade 100 AFEMA) using Tissue Lyser II apparatus (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 1 min at 30 Hz. The lysed tissues were mixed with chloroform and incubated on ice for 5 min before centrifugation (12,000 x g, 15 min, 4°C). The supernatant was subjected to RNA purification with RNeasy MinElute Cleanup kit according to manufacturer (ref: 74204, Qiagen). For Adult tissues, 2 to 50 frogs were required (based on the mass of tissue removed). Tissues were isolated, flash frozen, and stored at -80°C. Tissue lysis was performed in 5 ml of RNABle with an ultra turrax. The lysed tissues were mixed with chloroform and incubated on ice for 5 min before centrifugation (12,000 x g, 15 min, 4°C). The supernatant was subjected to RNA purification with RNeasy MidElute Cleanup kit according to manufacturer (ref: 75142, Qiagen). RNA concentration was measured by optic density. RNA quality was estimated by microcapillary electrophoresis using Qiaxel (Qiagen).

RT-qPCR analysis

Potential contamination by genomic DNA was removed using DNase treatment as described by the provider (ref: AM1907; Turbo DNA free; Ambion, LifeTechnologies, Courtaboeuf, France). Reverse transcription (RT) was done as previously described (Bliesimo et al., 2011) using Superscript III reverse transcriptase (ref: 1808004; LifeTechnologies, Fisher Scientific, Illkirch, France). RT products were analyzed by real-time qPCR performed on an ABI 7300 (Applied Biosystems). Primers were designed using Primer express (Applied Biosystems). The list of used primers is given in Supplemental Table 1. Prism 7300 system software (Applied Biosystems) was used to analyze the results. Data are presented in means of Log(2 $\Delta\Delta$ CT) and SEM (CT, cycle time). The raw data of three biological replicates are first normalized on the endogenous control gene rpl8 (Δ CT: mean CT rpl8 minus mean CT gene of interest) followed by Log transformation, so the variances between

groups succeed the t-test. For statistical analysis, the Log of the normalized data was subjected to a one-sample two-tailed t test ($\alpha=5\%$).

Processing of RNA-Seq data

Conventional RNA-Seq was carried out on SOLID platform following the manufacturer instructions and reads were mapped using Bioscope pipeline. Paired-end RNA-Seq was carried out by SERVICEXS (www.servicexs.com, Leiden, Netherlands) on the Illumina HiSeq platform. Reads were processed with Tophat (v2.0.6) and Cufflinks (v2.0.2) run with default parameters, except for the Tophat r parameter set to 100.

Construction of RNA-PET libraries

A 27-bp DNA tag sequence from each end of the full length cDNA was then extracted after a type III restriction enzyme (EcoP15I) digestion. The resulting Paired End dITag fragment (27bp-linker-27bp) was ligated to sequencing adaptors at both ends, amplified by PCR, and purified as templates for paired end (PE) sequencing with Illumina system. Construction of the RNA-PET genomic libraries (supplementary Figure 15) was using an improved and modified protocol version to the previous "GIS-PET", which had been published and described in Ng et al. (2005). Briefly, full length polyA mRNA were purified from high quality total RNAs with MACs polyT columns. Approximately one to two micrograms of purified mRNA were used for reverse transcription into full length cDNA, which were then biotinylated at the ends. Double stranded cDNAs were then circularized after ligation to specific DNA linker sequences. The 5' and 3' ends (27-27 bp) tags were then extracted through EcoP15I digestion and resulting PET templates [5'-27bp-linker—27bp-3'] which were purified from mixture by binding to streptavidin magnetic beads. Illumina sequencing adaptors were then ligated at both ends and PCR-amplified and sequenced by paired end reads at 2 x 36 bp long. Reads quality was assessed with standard quality controls. The modified version of the RNA-PET construction has two major changes: 1) it generates longer (27/27bp, in contrast to the previous 18/20bp) paired end tags from 5' and 3' ends of transcripts, by using a type III restriction enzyme EcoP15I, 2) eliminated bacterial-cloning procedures.

Processing of RNA-PET data

For each library, paired reads were independently mapped using bowtie version 0.12.7 (Langmead et al, 2009), with stringent parameters ($t=22$, $n=0$, $m=1$). After merging, mate pairs were subject to a stringent filter, so that only those for which both end map at a unique genomic location are retained. The orientation of transcript was resolved by looking for the three prime end-specific signature AACTGCTG in both mate pair with a modified version of the Smith and Waterman algorithm (Smith and Waterman, 1981). Only pairs with a 3' end signature at one end were kept for further processing. Clustering was carried out by using a greedy algorithm aggregating together PETs sharing overlapping 5' end tags. Models unsupported by RNA-Seq reads (<5 reads per kb) were discarded. The final models were further size filtered to reduce background noise originating from small artifactual models (see main text). All these were carried out with custom python scripts, cython and a C library.

Gene re-annotation

The annotation of the gene set was improved by integrating paired end RNA-Seq to Ensembl models, with the MAKER2 and EVM pipelines, following guidelines available from the respective web sites (<http://gmod.org/wiki/MAKER>, <http://evidencemodeler.sourceforge.net/>).

Antibodies

The TR antibody has been previously described for use in ChIP assay (Bilesimo et al. 2011). RNA Poll antibody (CTD4H8) was from Epigentec (A-2032; Euromedex, Souffelweyersheim, France).

ChIP and qPCR analysis

Up to 30 to 50 mg dissected tissues from seven euthanized tadpoles were used to isolate chromatin. ChIP was done as previously described with slight modifications (Bilesimo et al. 2011). ChIP products were analyzed by real-time qPCR as previously described (Bilesimo et al. 2011). The results were expressed as percent of input and presented as means SEM of at least three independent experiments.

Statistical analyses were performed with a paired two-tailed t test ($\alpha=5\%$). The list of used primers is given in Supplemental Table 1. For ChIA-PET analysis, chromatin was isolated from a batch of 8 samples and subject to ChIP and ChIA-PET procedure (Fullwood et al., 2009). For the RNA-Pol II ChIP-Seq, ChIP was carried out on chromatin extract prepared from a batch of 20 samples. The ChIP product was purified by phenol chloroform extraction with Phase lock gel and ethanol precipitation. Sequencing of the RNA Pol II ChIP product was outsourced SERVICEXS (Leiden, Netherlands).

Preparation of genomic DNA

Genomic DNA was prepared from liver and kidney of seven male and female adults. Tissues were dissected and directly disorganized with Qiagen Tissue Lyser (30 Hz, 20 sec.) and the lysate was cleared with Qiagen QIashredder columns (ref: 79654). Total DNA was extracted with DNA AllPrep DNA/RNA Mini columns (ref: 80204). All procedures were carried out according to the manufacturer's instructions.

Generation of DNA-PET libraries

To construct large insert DNA-PET libraries (Supplementary Figure 1), whole genome DNA was randomly hydrosheared, blunt end repaired, biotinylated and ligated to a specific DNA linker sequence at both ends. The linker-modified genomic DNA fragments were then gel-purified to obtain the size range (e.g., 10 kb, or 15 bp) of interest, followed by circularization with linker ligation. The paired end tags (PET at 27/27bp) were then excised through a type III restriction enzyme EcoP15I digestion. Extracted PETs were purified by binding to streptavidin magnetic beads, followed by ligation with SOLiD-specific adaptors at both ends. The complete sequencing template structure of the DNA-PET is amplified by PCR and processed for SOLiD mate-pair sequencing. Reads quality was assessed with standard quality control procedures.

DNA-PET data processing

Data cleaning and mapping: The two DNA-PET (mate-pair) libraries were mapped using the SOLiD Corona-Lite pipeline, allowing 2 mismatches for each 25 bp tag. The Corona-Lite mate-rescue step was carried out allowing up to maximum 4

mismatches in a read. For each library the mapping pipeline produces two different sets of mapping results. The 'map' file contains all unique 5' and 3' mappings; the 'mates' file contains possible unique 5' – 3' pairings. If a read cannot be paired concordantly and has a (discordant) unique 5' and 3' mapping, the discordant pair is listed in the 'mates' file instead.

Scaffold splitting: We determined concordant PET range of IXT010 to be within 5997-11961 bp and that of IXT011 to be within 9318-22026 bp. We analyzed the concordant PET fragment coverage across the reference genome to determine possible mis-assemblies. At any instance where the concordant PET fragment coverage drops to 0 (a.k.a. assembly breakpoint), the scaffold was split into two different scaffolds. This resulted in 19,847 scaffolds. Furthermore, we split the resulting scaffolds at continuous blocks of 10,000 or more 'N's, provided there are no PET mappings spanning over these regions (21909 scaffolds).

Identifying repeat regions: Since the presence of repeated sequences can interfere with the scaffolding process, regions, which could have more multiple copies across the genome were identified (but assembled into a single region in the assembly). The assembly sequence was binned in 1000 bp windows, the number of unique 5' and 3' mappings in each window was counted. Any windows with more than 500 tags were treated as 'repeated regions' and were discarded.

Building graph: This step consists of bridging together scaffolds connected by sets of discordant PETs. Keep track that the resolution of this step is limited by the size of the DNA fragments used to build the libraries. A node in a graph represents each scaffold and DNA-PET discordant PETs are represented by an edge. When ≥ 3 discordant PETs connect the end of one scaffold to the end of another scaffold, they are linked with a weight equal to the total number of end-to-end discordant PETs they share. Each library (IXT010 and IXT011) was processed separately and they have their own distinct set of edges. For keeping track of the splitting process at assembly breakpoints, we introduced extra edges with weight 1 connecting the two scaffolds that were split at a blocks of 'NNN'.

Scaffolding: An ordering of contigs is given a score based on how well it satisfies its edges. If the given ordering makes an edge "Concordant" (similar to PETs) the weight of edge is added to the total score of the ordering. If the edge is not concordant, relative to the given ordering, the weight of the edge is subtracted from

the total score. The final contig ordering is found by trying to maximize the score for each scaffold. A heuristic algorithm carries this out. For further details of this algorithm, kindly refer to scaffolding section of PE-Assembler paper.

ChIA-PET analysis and processing of ChIA-PET data

The entire ChIA-PET analysis procedure consists of three main parts: ChIP sample prep, ChIA-PET library construction, and PET sequencing and mapping. Briefly, a typical ChIA-PET analysis starts with proper ages of cell culture; primary cells, or dissected tissues, which are cross-link fixed by proper chemical agent, and lysed for release of proper chromatin complex containing relationship between particular DNA region(s) and protein(s). Cross-linked chromatin complex (DNA/Protein) are fragmented by sonication to a given size range (~200-600bp), and enriched by chromatin immunoprecipitation (ChIP) method with a specific antibody of interest. In the enriched chromatin complexes, tethered DNA fragments (spatial located) are joined together by specifically designed DNA linkers through "proximity ligation", and joined DNA fragment are then extracted for PET template, followed by high-throughput NGS sequencing. PET sequences are mapped to a reference genome, which can reveal genome-wide protein/DNA relationship of 1) binding sites (like ChIP-Seq data), and 2) long-range chromatin interaction relationships between two remote loci brought together by protein(s) at the interest.

Acknowledgments

We thank Dr N. Pollet for helpful discussions during the progression of this study. We also thank J.-P. Chaumeil and G. Benisti for animal care. We thank Zhenhui Zhang, Huay Mei Poh, Alexis KHNG Jiaying for DNA-PET, RNA-PET and ChIA-PET construction, and GIS GTB sequencing group personnel Jo Ong, Yen Ling Lee, Dawn Choi Poh, See Ting for SOLiD and Illumina sequencing production).

This work was supported by the "Centre National de la Recherche Scientifique", the "Muséum National d'Histoire Naturelle", "CRESCENDO", an Integrated Project funding from FP6 (contract n°LSHM-CT-2005-018652), "TRIGGER" (ANR-08-JCJC-0100-01) and "IDEAL", a large Integrated Project funding from FP7

(contract n°259679). PB was supported by a "CIFRE" grant, Watchfrog and an ARC grant ("Association de Recherche contre le Cancer"). LS and YR were recipients of a Merlion Project (contract n°5.01.10).

Figure Legends

Figure 1. DNA-PET significantly improves genome assembly.

A, D. Fraction of each scaffold left unsequenced (expressed in per cent) as a function of size, in log scale. The initial genome assemble is plotted on the top, and the improved assembly of the bottom. The number of scaffolds chained together by dPETs (chain length, in number of scaffolds) is indicated by blue, green and red colors. Purple circles denote the scaffolds corresponding to ~80% of the assembly. B. Raw DNA-PET data mapping statistics. C. Statistics of genome assembly improvement. E. Distribution of the number of scaffolds connected together with dPETs, showing that a large fraction of the total scaffolds are connected together into long chains. F. Example of re-scaffolding. A total of 15 scaffolds are linked together by dPETs. Tracks from top to bottom: scaffold name, assembly gap size, connectivity, number of dPETs per link for each DNA-PET library. The two scaffolds containing assembly gaps were split before re-scaffolding. Colored numbers indicate the number of independant dPETs supporting each connection, for each library.

Figure 2. RNA-PET efficiently captures transcripts ends.

A. Overlap between RNA-Seq reads and Ensembl and RNA-PET-based models. B. Demarcation of gene model boundaries by RNA-PET. The histogram shows the relative size of Ensembl gene models in bins of various sizes. C. Enrichment of RNA-Pol II around ensembl gene models and RNA-PET-based models. This shows that RNA-Pol II density fits well with RNA-PET based models, but not Ensembl models.

Figure 3. Examples of genome annotation improvements.

Track order: Ensembl models, RNA-PET based models, RNA-PET diags, RNA-Seq reads density. A, B, C: sumo1, cadm2 and kiaa1958 loci. D: Un-annotated gene

split over scaffold_1031 and scaffold_1460.

Figure 4. Benefit of genome re-annotation with RNA-PET for ChIA-PET analysis.

A. Large genomic view of the bcl6 locus. Track order: Ensembl genes, RNA-PET-based models, ChIA-PET TR binding density, interaction PETs, RNA Pol-II binding density, RNA-Seq reads density with (+T₃) and without (-T₃) treatment with thyroid hormones. B. Close up on TR binding sites. Track order: ensembl genes, RNA-PET-based genes, location of ChIP-qPCR probes, RNA-PET diags, TR binding density, RNA Pol-II binding density. C: ChIP-qPCR validation of TR binding at locations shown in B. Ab: Antibody, T₃: 3',5,3' triiodothyronine treatment. D: Induction of trpg1, lpp and bcl6 genes transcription, assayed by RT-qPCR. E: Three-dimensional model of the locus topology.

Figure 5. Benefit of genome re-annotation with RNA-PET for ChIA-PET analysis.

A. Genomic view of an unannotated gene. Track order: Ensembl genes, RNA-PET-based models, ChIA-PET TR binding density, RNA Pol-II binding density, RNA-Seq reads density with (+T₃) and without (-T₃) THs treatment. B. Close up of TR binding sites. Track order: Ensembl genes, RNA-PET-based genes, location of ChIP-qPCR probes, RNA-PET PETs, TR binding density, RNA Pol-II binding density. C: ChIP-qPCR validation of TR binding at locations shown in B. Ab: antibody, T₃: 3',5,3' triiodothyronine treatment. D: Transcriptional induction, assayed by RT-qPCR.

References

Adelman,K. and LisJT., 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. Nat Rev Genet 13:720-731

Bernstein,B.E., Birney,E., Dunham,I., Green,E.D., Gunter,C. and Snyder,M. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 489:pp.

- Bliesimo ,P., Jolivet,P., Alfama,G., Buisine,N., Le Mevel,S., Havis,E., Demeneix,B.A. and Sachsl.M. 2011. Specific histone lysine 4 methylation patterns define tr-binding capacity and differentiate direct T3 responses. *Mol Endocrinol* 25:pp. 225-237
- Bombarely ,A., Rosli,H.G., Vrebalov,J., Moffett,P., Mueller,L.A. and MartinG.B. 2012. A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol Plant Microbe Interact* 25:pp. 1523-1530
- Buchholz ,D.R., Paul,B.D., Fu,L. and ShiY. 2006. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the african clawed frog. *Gen Comp Endocrinol* 145:pp. 1-19
- Buisine ,N. and Sachsl. 2009. Impact of genome assembly status on Chip-Seq and Chip-Pet data mapping. *BMC Res Notes* 2:p. 257
- Earl ,D., Bradnam,K., St John,J., Darling,A., Lin,D., Fass,J., Yu,H.O.K., Buffalo,V., Zerbino,D.R., Diekhans,M.et al. 2011. Assemblathon 1: a competitive assessment of *de novo* short read assembly methods. *Genome Res* 21:pp. 2224-2241
- Eckalbar ,W.L., Hutchins,E.D., Markov,G.J., Allen,A.N., Corneveaux,J.J., Lindblad-Toh,K., Di Palma,F., Alfoldi,J., Huettelman,M.J. and Kusumik. 2013. Genome reannotation of the lizard *Anolis carolinensis* based on 14 adult and embryonic deep transcriptomes. *BMC Genomics* 14:p. 49
- Fullwood ,M.J., Liu,M.H., Pan,Y.F., Liu,J., Xu,H., Mohamed,Y.B., Orlov,Y.L., Velkov,S., Ho,A., Mei,P.H.et al. 2009. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 462:pp. 58-64
- Fullwood ,M.J., Wei,C., Liu,E.T. and RuanY. 2009. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses.

- Furey ,T.S. 2012. Chip-Seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-dna interactions. *Nat Rev Genet* 13:pp. 840-852
- Gibcus ,J.H. and DekkerJ. 2013. The hierarchy of the 3D genome. *Mol Cell* 49:pp. 773-782
- Graveley ,B.R., Brooks,A.N., Carlson,J.W., Duff,M.O., Landolin,J.M., Yang,L., Artieri,C.G., van Baren,M.J., Boley,N., Booth,B.W.et al. 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471:pp. 473-479
- Grimaldi ,A.G., Buisine,N., Bliesimo,P. and Sachsl.M. 2013. High-throughput sequencing will metamorphose the analysis of thyroid hormone receptor function during amphibian development. *Curr Top Dev Biol* 103:pp. 277-303
- Grimaldi ,A., Buisine,N., Miller,T., Shi,Y.-B. and Sachsl.M. 2013. Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: lessons from amphibian studies. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3882-3892
- Haas ,B.J., Salzberg,S.L., Zhu,W., Pertea,M., Allen,J.E., Orvis,J., White,O., Buell,C.R. and WortmanJ.R. 2008. Automated eukaryotic gene structure annotation using evidencemodeler and the program to assemble spliced alignments. *Genome Biol* 9:p. R7
- Helsten ,U., Harland,R.M., Gilchrist,M.J., Hendrix,D., Jurka,J., Kapitonov,V., Ovcharenko,I., Putnam,N.H., Shu,S., Taher,L.et al. 2010. The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 328:pp. 633-636
- Holt ,C. and YandellM. 2011. Maker2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. *BMC Bioinformatics* 12:p. 491

- Hoskins ,R.A., Carlson,J.W., Kennedy,C., Acevedo,D., Evans-Holm,M., Frise,E., Wan,K.H., Park,S., Mendez-Lago,M., Rossi,F.et al. 2007. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. Science 316:pp. 1625-1628
- Huang ,Y., Chen,W., Wang,X., Liu,H., Chen,Y., Guo,L., Luo,F., Sun,J., Mao,Q., Liang,P.et al. 2013. The carcinogenic liver fluke, *Clonorchis sinensis*: new assembly, reannotation and analysis of the genome and characterization of tissue transcriptomes. PLoS One 8:p. e54732
- Laudet ,V. 2011. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. Curr Biol 21:p. R726-37
- Langmead ,B., Trapnell,C., Pop,M. and Salzberg,S.L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Bio 10:p. R25
- Li ,R., Fan,W., Tian,G., Zhu,H., He,L., Cai,J., Huang,Q., Cai,Q., Li,B., Bai,Y.et al. 2010. The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome. Nature 463:pp. 311-317
- Li ,G., Ruan,X., Auerbach,R.K., Sandhu,K.S., Zheng,M., Wang,P., Poh,H.M., Goh,Y., Lim,J., Zhang,J.et al. 2012. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. Cell 148:pp. 84-98
- Lin ,M.F., Carlson,J.W., Crosby,M.A., Matthews,B.B., Yu,C., Park,S., Wan,K.H., Schroeder,A.J., Gramates,L.S., St Pierre,S.E.et al. 2007. Revisiting the protein-coding gene catalog of *Drosophila melanogaster* using 12 fly genomes. Genome Res 17:pp. 1823-1836
- Mardis ,E.R. 2011. A decade's perspective on DNA sequencing technology. Nature 470:pp. 198-203
- Nieuwkoop,P.D. and Faber,J. 1967. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), 2nd ed., North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Ng ,P., Wei,C., Sung,W., Chiu,K.P., Lipovich,L., Ang,C.C., Gupta,S., Shahab,A., Ridwan,A., Wong,C.H.et al. 2005. Gene identification signature (GIS) analysis for transcriptome characterization and genome annotation. Nat Methods 2:pp. 105-111
- Reese ,M.G., Hartzell,G., Harris,N.L., Ohler,U., Abril,J.F. and Lewis,E. 2000. Genome annotation assessment in *Drosophila melanogaster*. Genome Res 10:pp. 483-501
- Ruan ,Y., Ooi,H.S., Choo,S.W., Chiu,K.P., Zhao,X.D., Srinivasan,K.G., Yao,F., Choo,C.Y., Liu,J., Arivarane,P.et al. 2007. Fusion transcripts and transcribed retrotransposed loci discovered through comprehensive transcriptome analysis using paired-end diags (PETs). Genome Res 17:pp. 828-838
- Ruan ,X. and Ruan,Y. 2012. Genome wide full-length transcript analysis using 5' and 3' paired-end-tag next generation sequencing (RNA-PET). Methods Mol Biol 809:pp. 535-562
- Sanyal ,A., Lajoie,B.R., Jain,G. and Dekker,J. 2012. The long-range interaction landscape of gene promoters. Nature 489:pp. 109-113
- Schmutz ,J., Wheeler,J., Grimwood,J., Dickson,M., Yang,J., Caoile,C., Bajorek,E., Black,S., Chan,Y.M., Denys,M.et al. 2004. Quality assessment of the human genome sequence. Nature 429:pp. 365-368
- Shi, 1999. Amphibian metamorphosis: From morphology to molecular biology (1st ed). Wiley-Liss, New York
- Smith ,T.F. and Waterman M.S. 1981. Identification of common molecular subsequences. J Mol Biol 147:pp. 195-197

- Tata ,J.R. 1993. Gene expression during metamorphosis: an ideal model for post-embryonic development. *Bioessays* 15:pp. 239-248
- Tata,J.R. 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 246: 10-20
- The modENCODE Consortium. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE. *Science* 330:pp.1787-1797
- The ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**: 57-74.
- Trapnell ,C., Pachter,L. and SalzbergS.L. 2009. Tophat: discovering smple junctions with ma-seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111
- Trapnell ,C., Williams,B.A., Pertea,G., Motazavi,A., Kwan,G., van Baren,M.J., Salzberg,S.L., Wold,B.J. and Pachter,L. 2010. Transcript assembly and quantification by ma-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28: 511-515
- Varshey ,R.K., Song,C., Saxena,R.K., Azam,S., Yu,S., Sharpe,A.G., Cannon,S., Baek,J., Rosen,B.D., Taran,B.et al. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol* 31:pp. 240-246
- Warren ,W.C., Hillier,L.W., Marshall Graves,J.A., Birney,E., Ponting,C.P., Grützner,F., Belov,K., Miller,W., Clarke,L., Chinwalla,A.T.et al. 2008. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 453: 175-183
- Wells ,D.E., Gutierrez,L., Xu,Z., Krylov,V., Macha,J., Blankenburg,K.P., Hitchens,M., Bellot,L.J., Spivey,M., Stemple,D.L.et al. 2011. A genetic map of *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol* 354:pp. 1-8
- Xu ,Q., Chen,L., Ruan,X., Chen,D., Zhu,A., Chen,C., Bertrand,D., Jiao,W., Hao,B., Lyon,M.P. et al. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:pp. 59-66
- Yandell ,M. and Ence D. 2012. A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nat Rev Genet* 13:pp. 329-342
- Yao ,F., Arivarane,P.N., Hillmer,A.M., Lee,W.H., Li,G., Teo,A.S.M., Woo,X.Y., Zhang,Z., Chen,J.P., Poh,W.T. et al. 2012. Long span DNA paired-end-tag (DNA-PET) sequencing strategy for the interrogation of genomic structural mutations and fusion-point-guided reconstruction of amplicons. *PLOS One* 7:p. e46152
- Zhou ,Q., Li,T. and Price D.H. 2012. RNA polymerase II elongation control. *Annu Rev Biochem* 81:pp. 119-143
- Zhuo ,Y., Liu,L., Wang,Q., Liu,X., Ren,B., Liu,M., Ni,P., Cheng,Y. and Zhang L. 2012. Revised genome sequence of *Burkholderia thailandensis* msmb43 with improved annotation. *J Bacteriol* 194:pp. 4749-4750

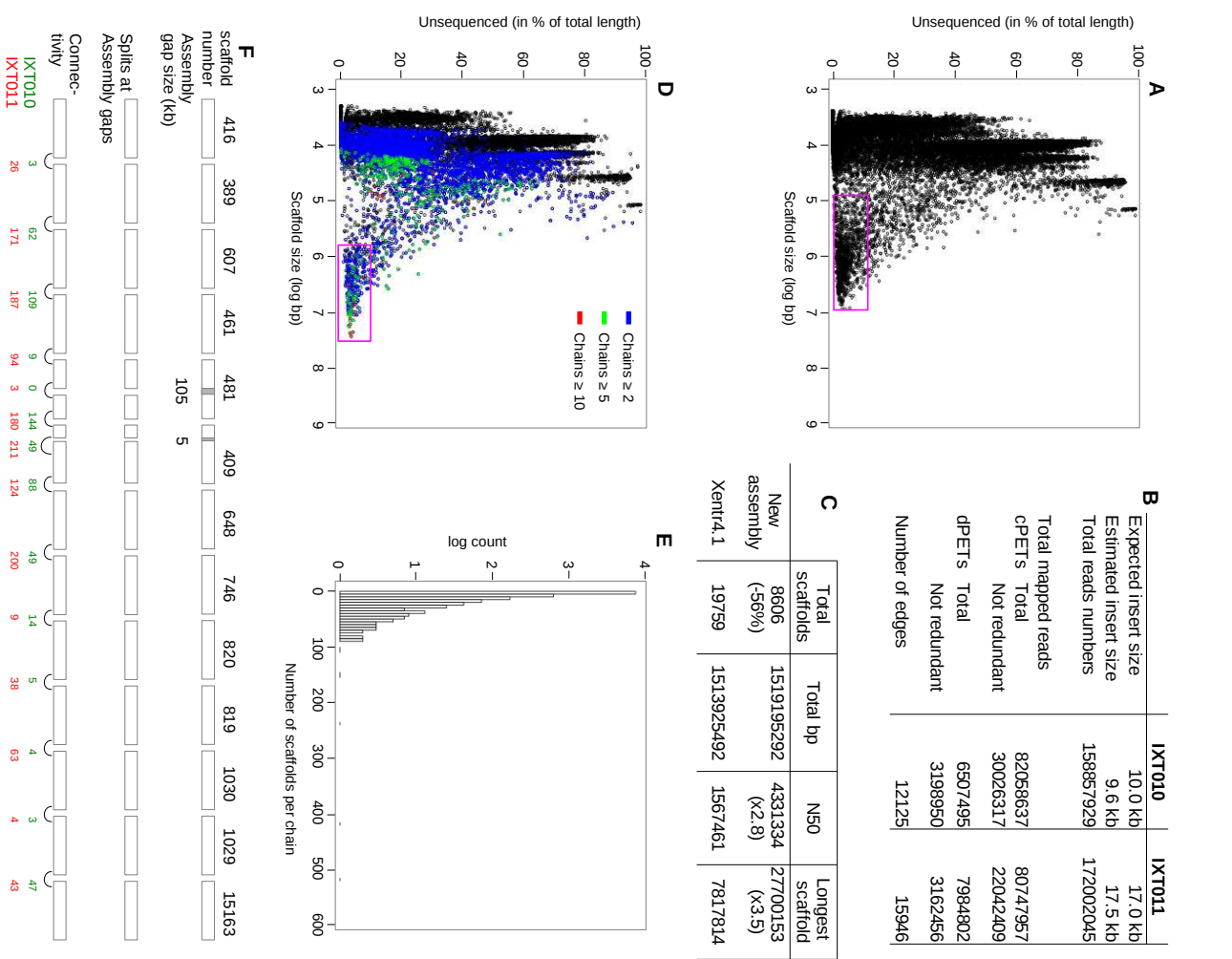


Fig. 1

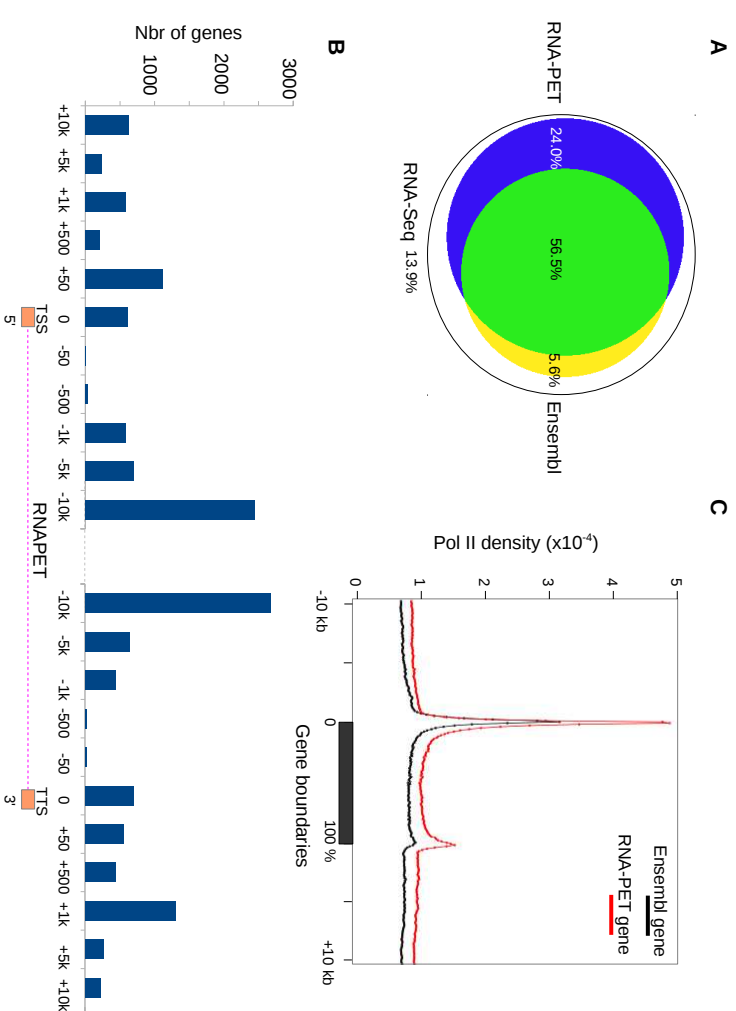


Fig. 2

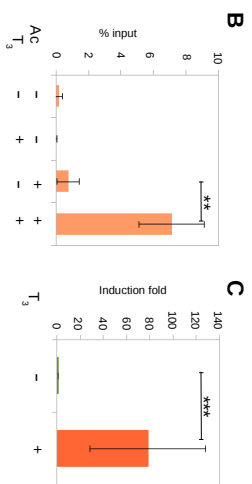
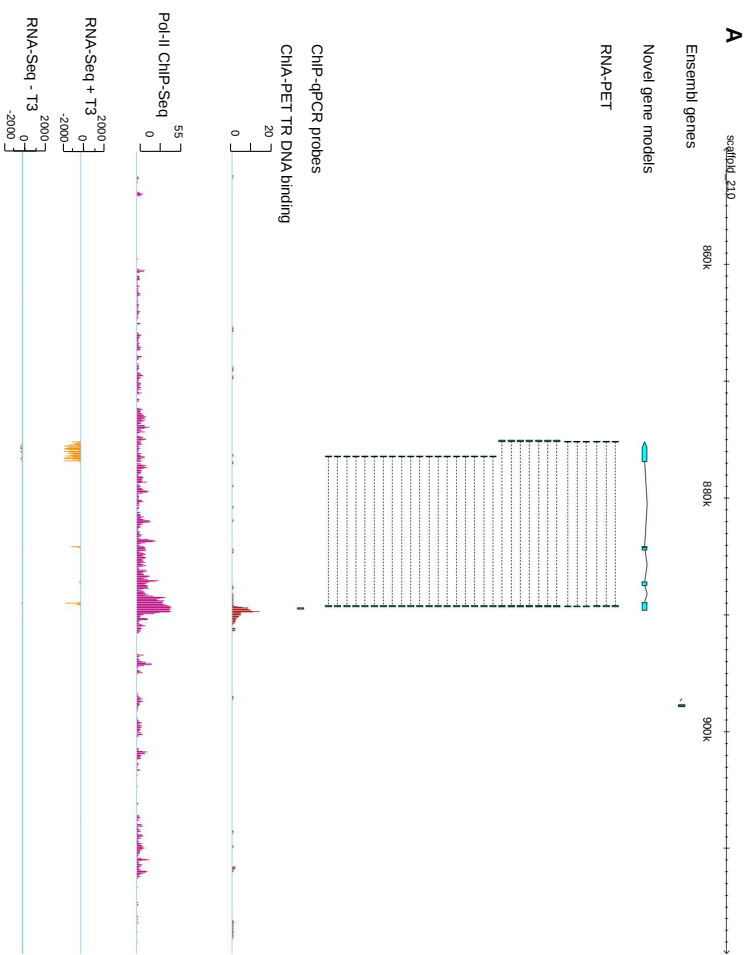
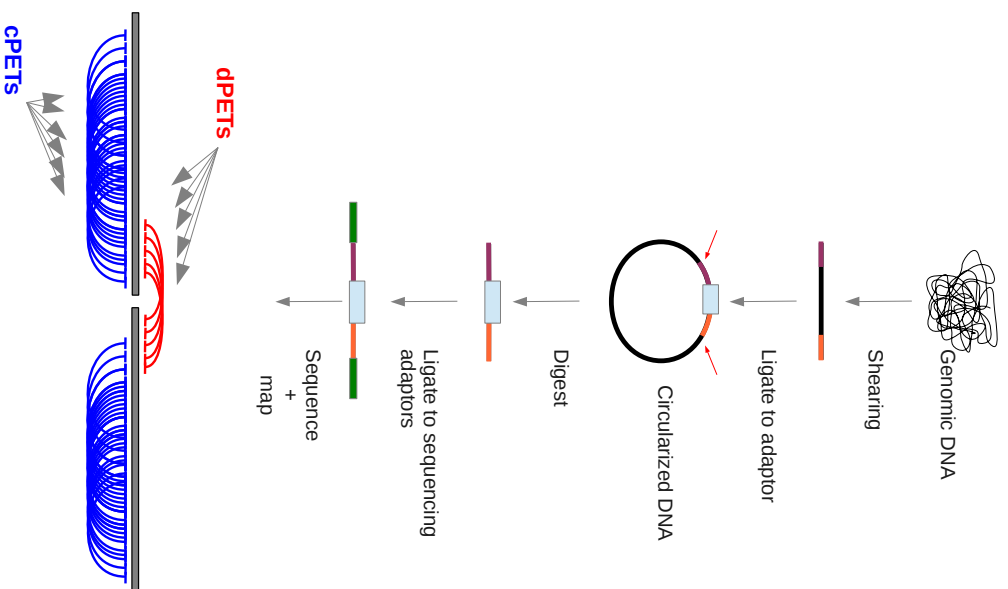
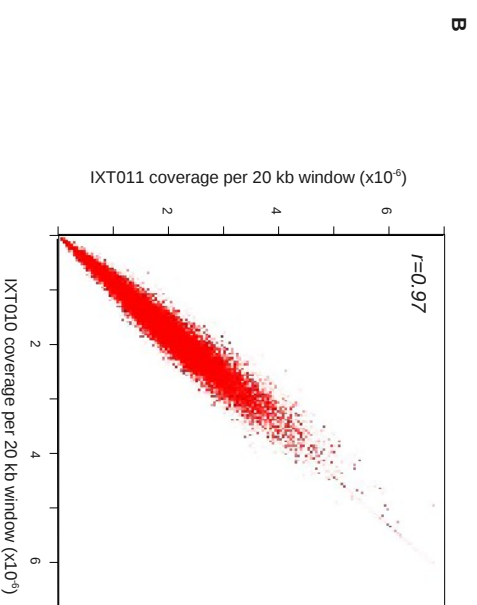
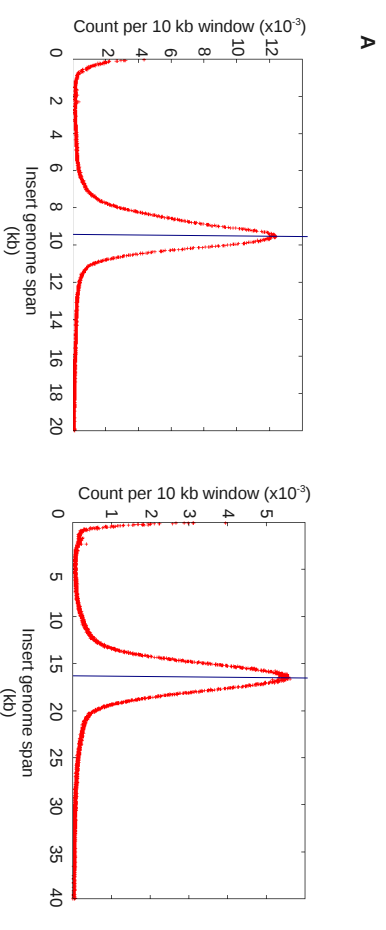


Fig. 5



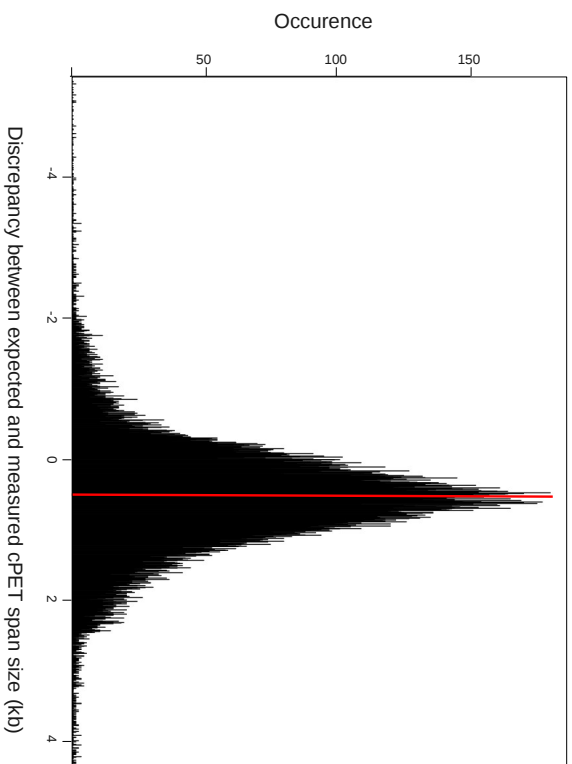
Supplementary Figure 1: Principle of DNA-PET.

Genomic DNA is fragmented in 10 or 17kb fragments and circularized with adaptors containing a EcoP15I restriction site (pale blue). After restriction with EcoP15I, released DNA fragments are ligated to sequencing adaptors (green), sequenced and mapped on the reference genome. cPETs (deep blue) correspond to PETs where the two tags map on the same scaffold whereas dPETs (red) correspond to PETs where the two tags map on different scaffolds. dPETs can be used to improve scaffolding. The 5' and 3' ends of sheared genomic DNA fragments are colored in purple and orange, respectively.



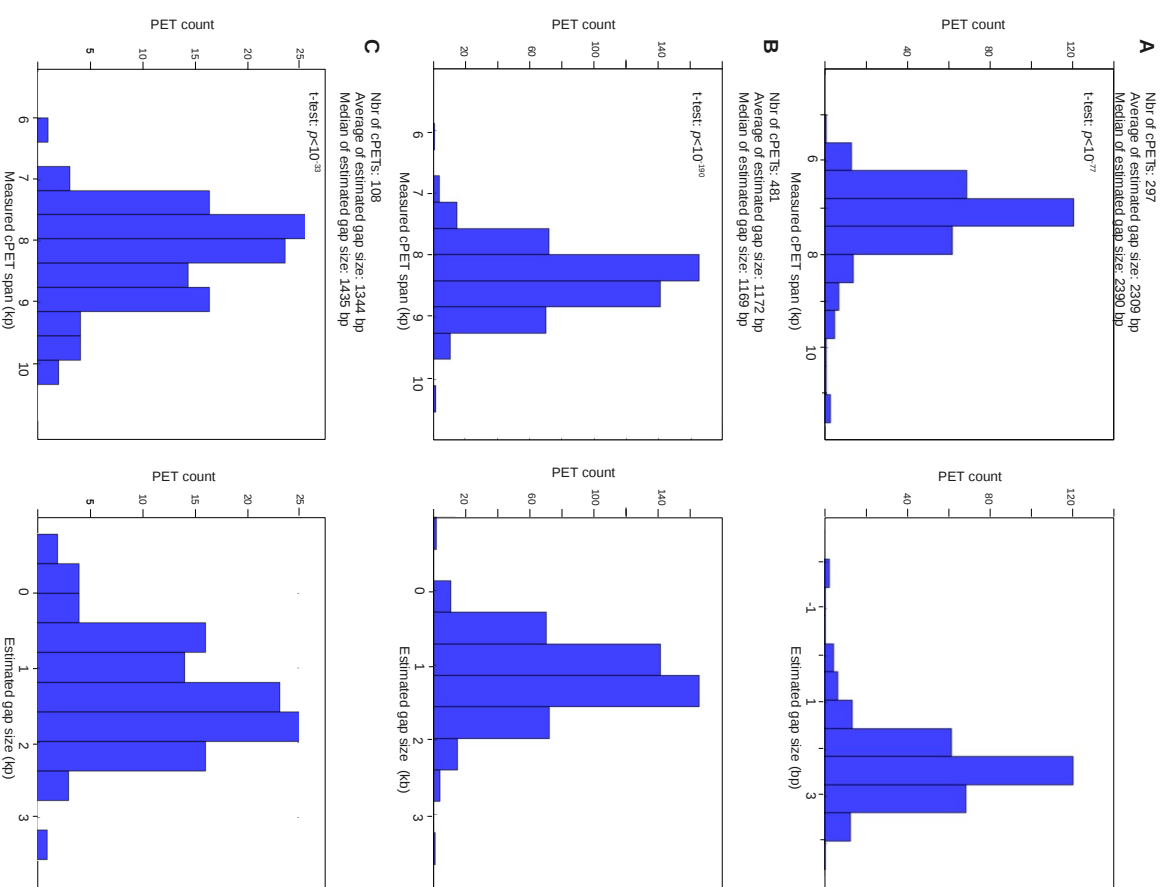
Supplementary Figure 2: Quality control of the DNA-PET datasets.

A. Insert size distribution of DNA-PET libraries of 9.6 (IXT010) and 17 kb (IXT011), estimated as the average genomic span of cPETs (blue line).
B. Correlation of coverage density between DNA-PET libraries IXT010 and IXT011, computed by scoring the number of cPETs overlapping successive 20 kb windows. The tight distribution indicates that the genome coverage derived with two independent libraries is highly correlated.



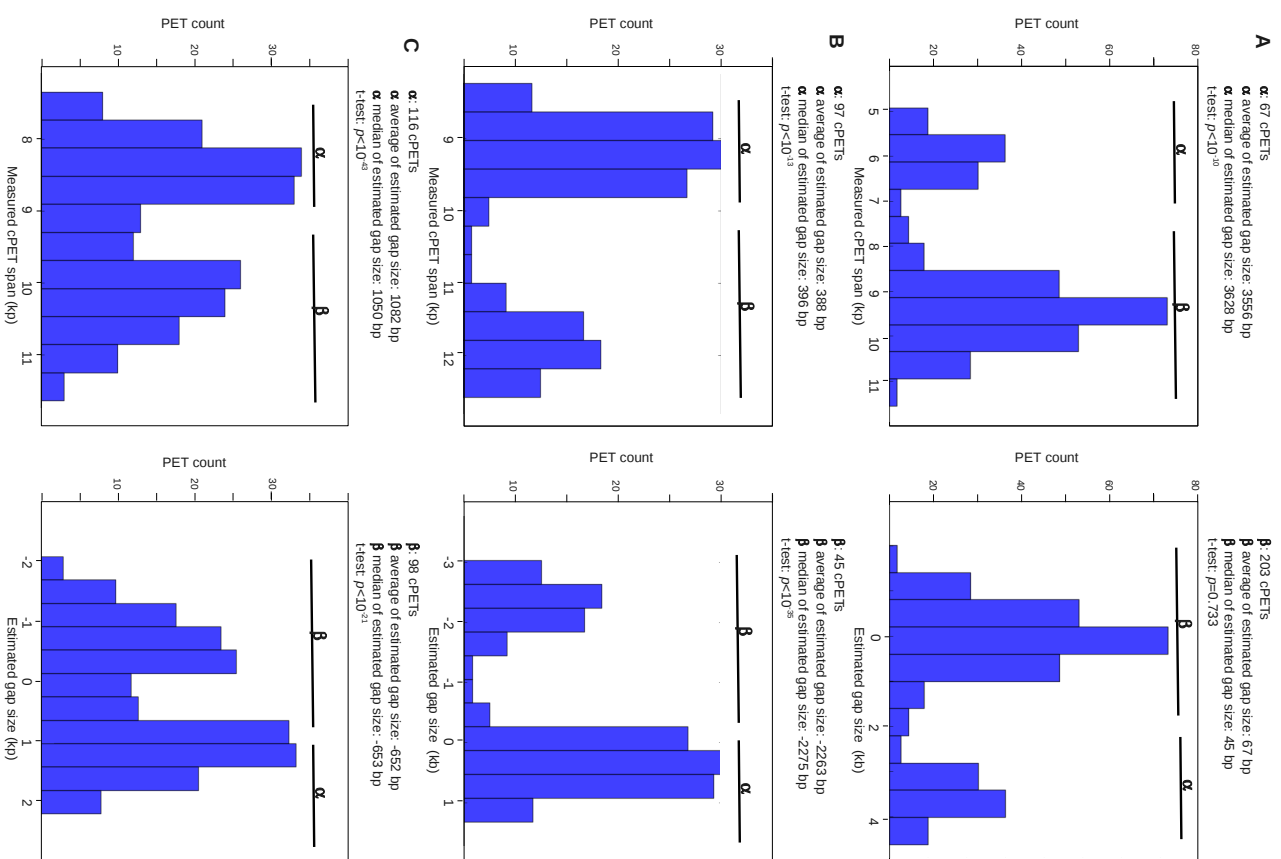
Supplementary Figure 3: Discrepancy between expected and annotated gap size, for 50 bp gaps.

The difference between the expected and the measured span of individual cPETs has been used to estimate the length of '50 bp gaps'. This measure of discrepancy is positive for cPETs overlapping a region that is actually larger than 50 bp and conversely for negative values. The red line represent the average value.

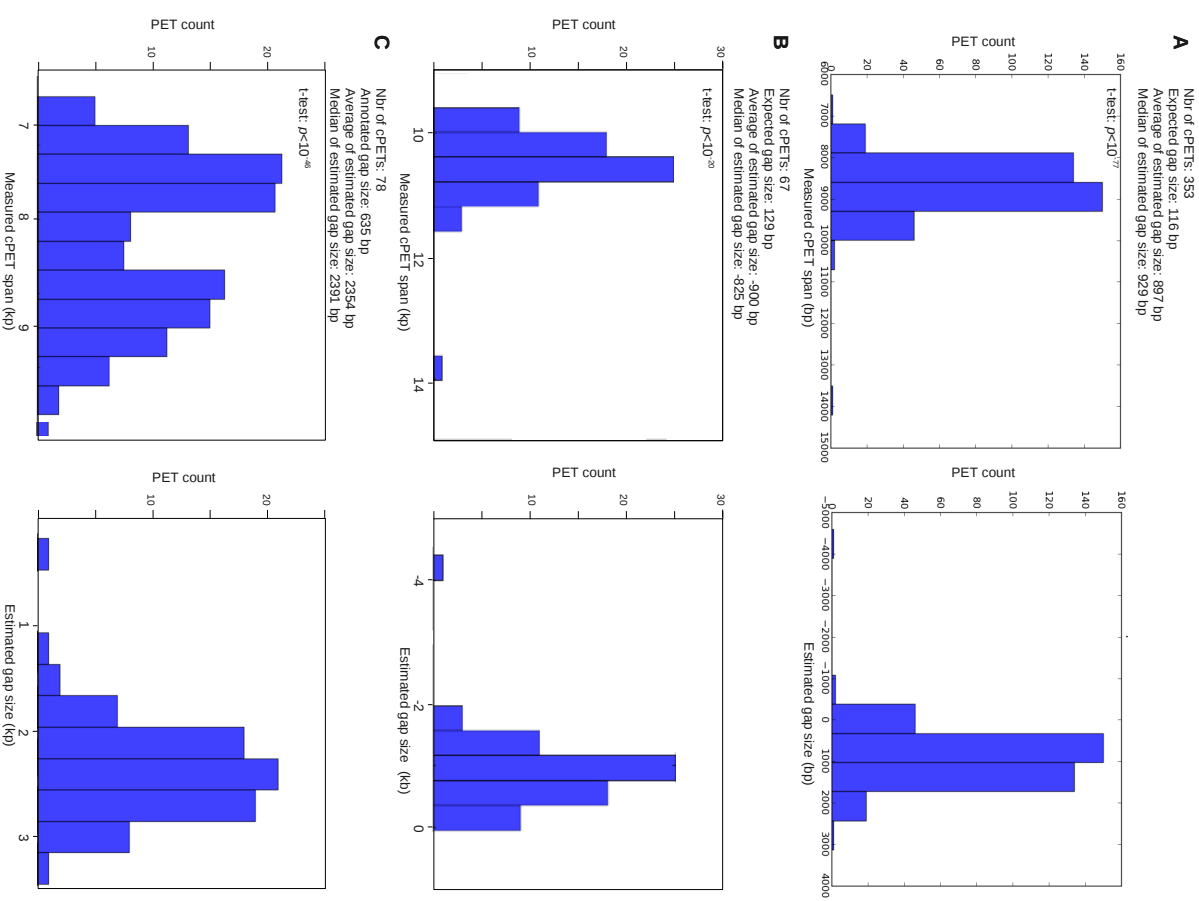


Supplementary Figure 4: Examples of discrepancy between expected and measured assembly gap length, for 50 bp gaps.

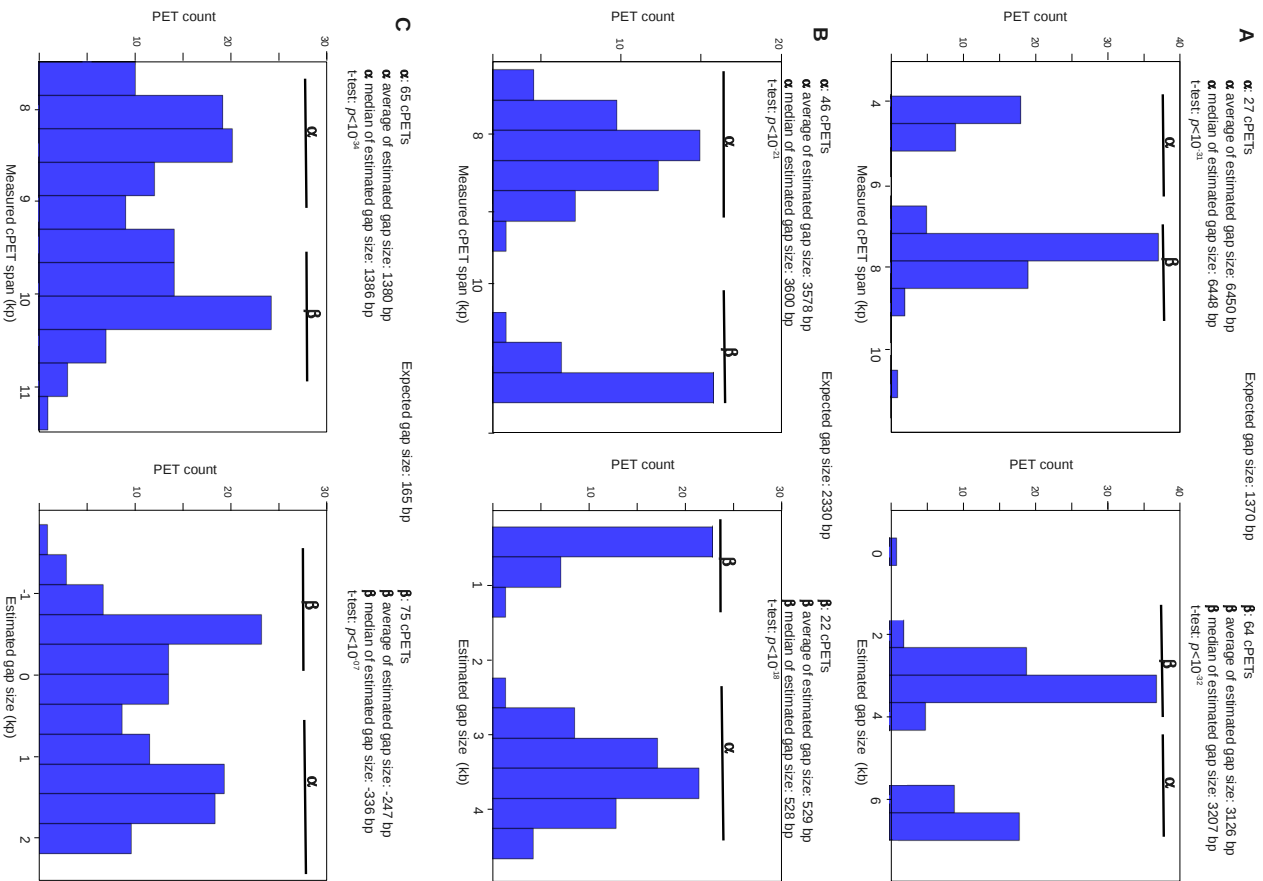
Individual cPETs spanning a single assembly gap of 50 bp have been used to estimate their actual length. For each cPET, the measured span size (left panel) was compared to the expected span size. Disagreements between expected and measured span sizes were used to derive independent estimate of the gap actual size (right panel). The number of cPETs, the average and median of the estimates are shown. A, B, C are three illustrative examples.



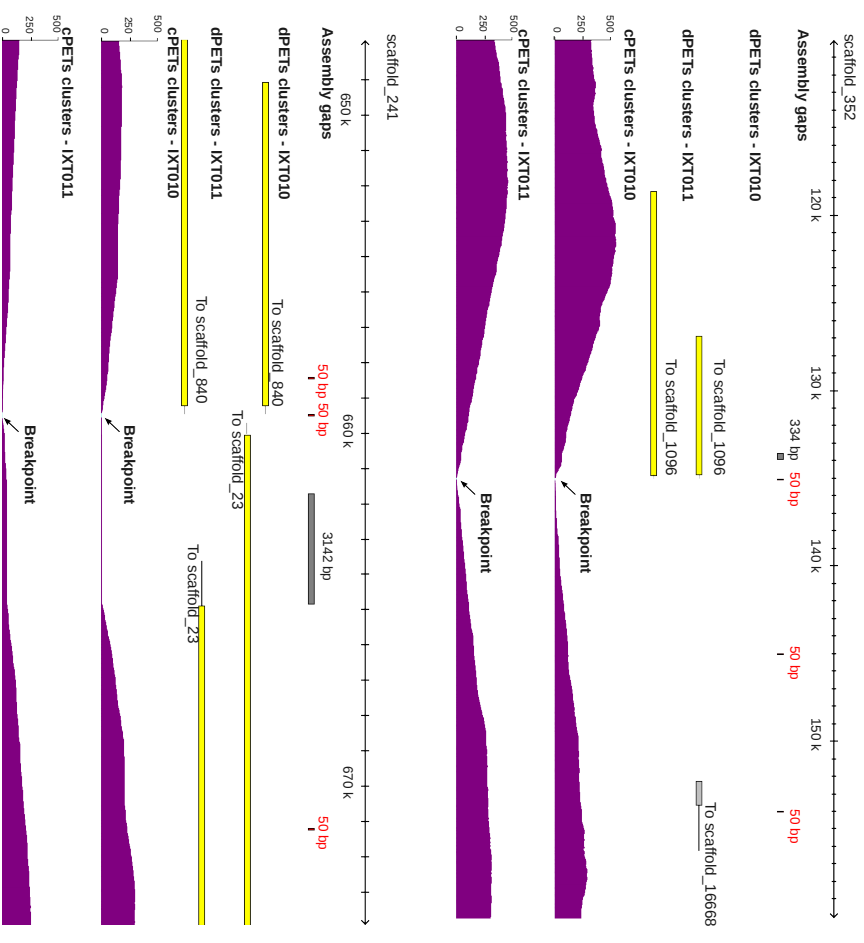
Supplementary Figure 5: Example of structural polymorphism at assembly gaps of 50 bp.
In a number of cases, the measure of the actual gaps length follows a binodal distribution, with two populations labeled α and β . See Supplementary Figure 4 for details. A, B and C are illustrative examples.



Supplementary Figure 6: Example of discrepancy between expected and measured assembly gap length, for assembly gaps other than 50 bp-long.
Individual cPETs spanning a single assembly gap ($\neq 50$ bp) have been used to estimate their actual size. See Supplementary Figure 4 for details. The number of cPETs, the expected size, the average and median of the estimates are shown. A, B, C are three illustrative examples.

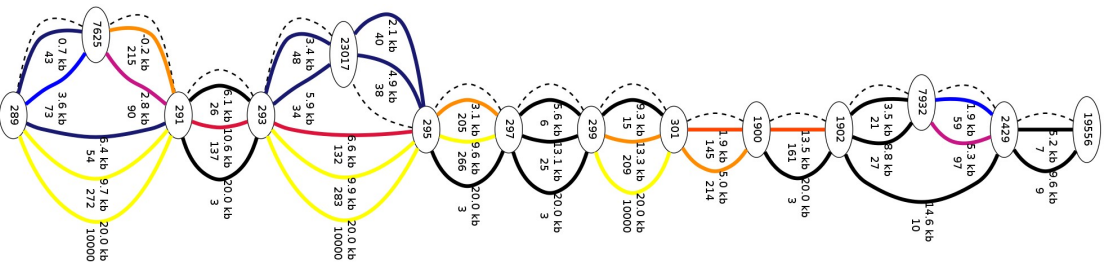


Supplementary Figure 7: Example of structural polymorphism at assembly gaps $\neq$ 50 bp.
In a number of cases, the measure of the actual gaps length follows a bimodal distribution, indicated α and β . See Supplementary Figure 4 for details. A, B and C are illustrative examples.



Supplementary Figure 8: Example of assembly breakpoints.

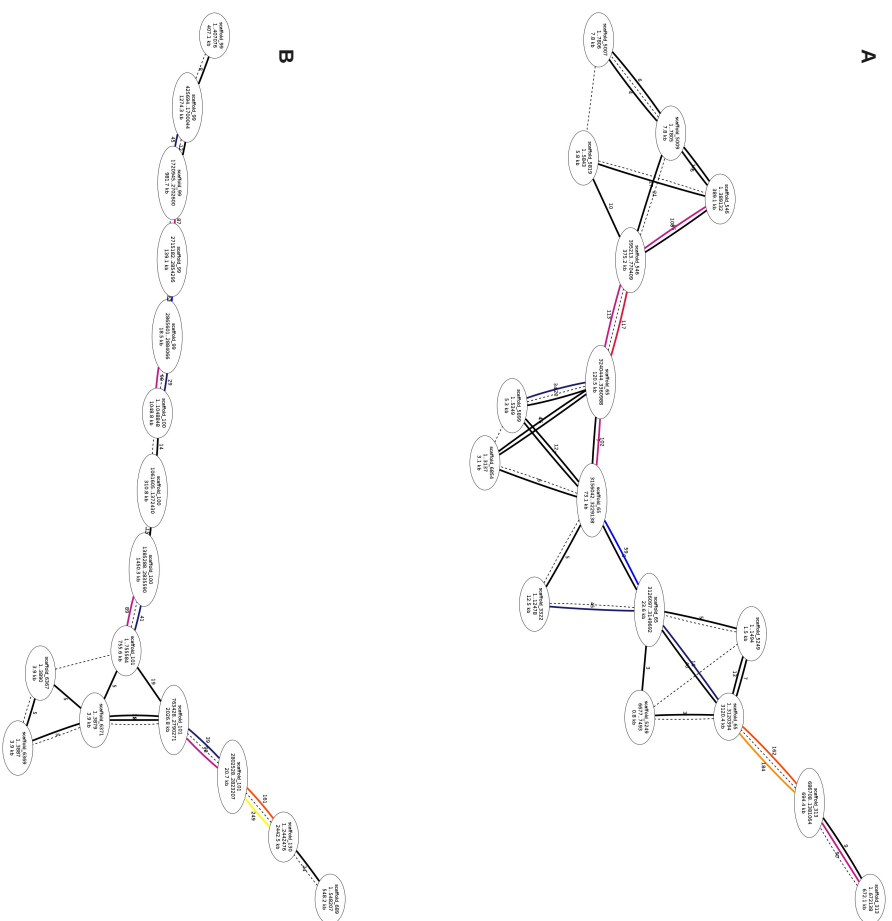
Genomic views two assembly break points. Track order: Assembly gaps, clusters of dPETs for DNA-PET libraries IXT010 and IXT011, cPETs coverage profile computed from libraries IXT010 and IXT011. The average insert size for these libraries is 9.6 kb and 1.7 kb, respectively. Numbers above assembly gaps indicate their length. Values in brackets correspond to their estimated length based on cPETs datas, when available. Assembly gaps of 50 bp are shown in red. Assembly breakpoints potentially occur when cPET coverage drops to zero, meaning that the two sides are not connected together, at the resolution of the DNA-PET libraries.



Supplementary Figure 9: Example of long range DNA-PET connectivity and re-scaffolding. Scaffolds are shown as ovals, indicating their number (e.g. 291 for scaffold_291). The dashed line corresponds to the path through the graph and represent the final ordering of the scaffolds relative to each other. Colored lines correspond to the connection and numbers indicate the estimated distance between scaffolds and well as dPETs support. Colors are heat map coded. In this example, a few small scaffolds (scaffold_7625, scaffold_23017, scaffold_7932) are nested between longer ones.

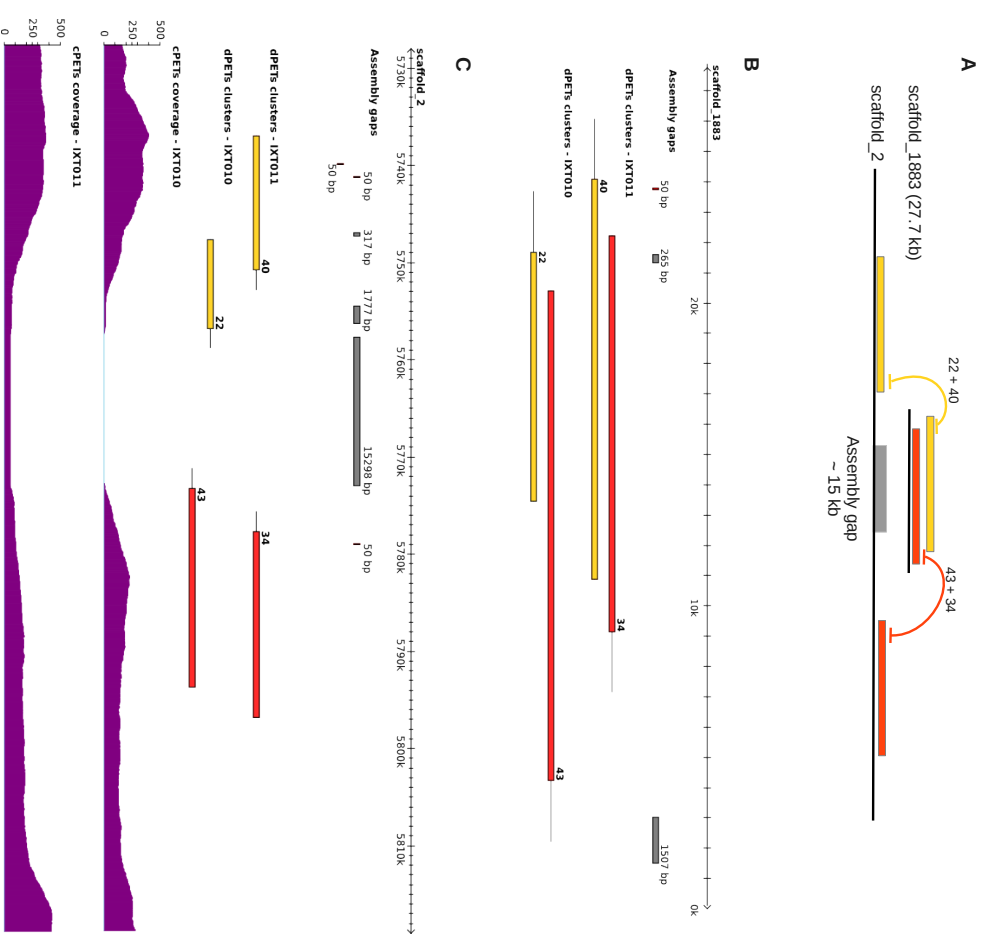


Supplementary Figure 10: Few examples of re-scaffolding. Scaffolds are shown as ovals, indicating their name. Colored lines correspond to the connection and numbers indicate the dPETs support. Colors are heat map coded. Bubble-like structure correspond to small scaffolds inserted into larger ones or result from the complex connectivity between tandemly arranged short scaffolds.



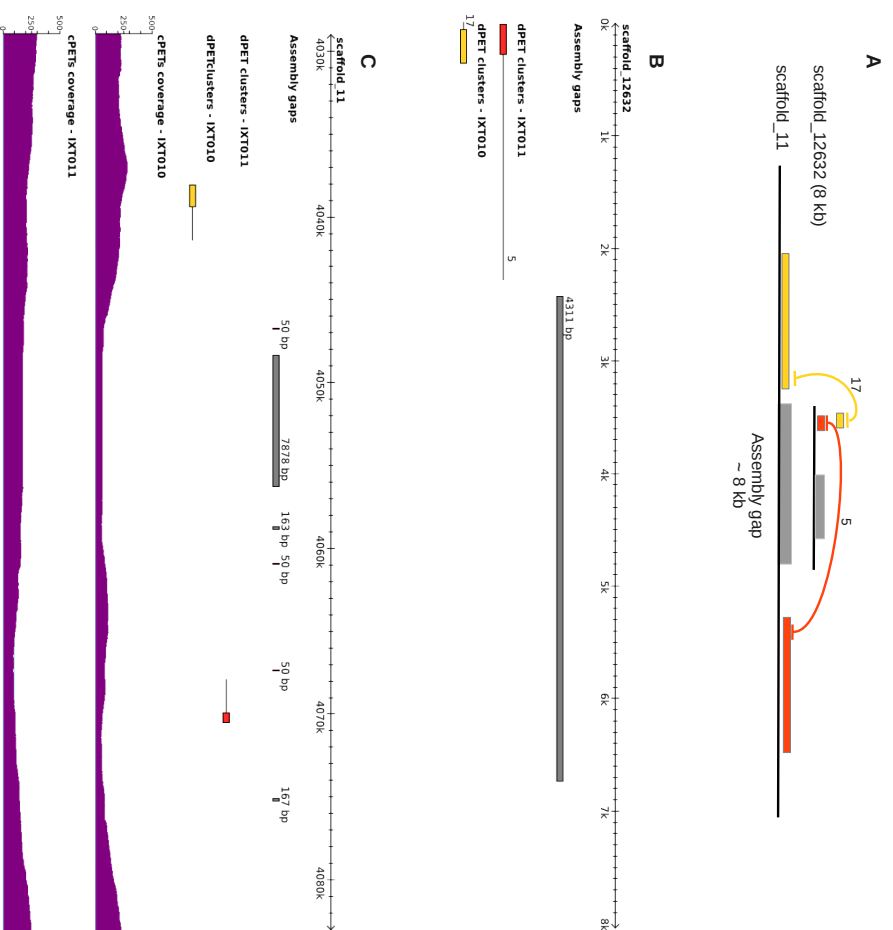
Supplementary Figure 11: Example of small scaffolds interted into assembly gaps of larger ones.

Scaffolds' fragments are shown as ovals, indicating their name (e.g. 291 for scaffold_291), which part of the original scaffold they correspond to, and their size. The dashed line corresponds to the path through the graph and represent the final ordering of the scaffolds relative to each other. Colored lines correspond to the connection and numbers indicate the cPETs support. Colors are heat map coded. A and B represent two examples of small scaffolds being inserted into assembly gaps present in larger ones.



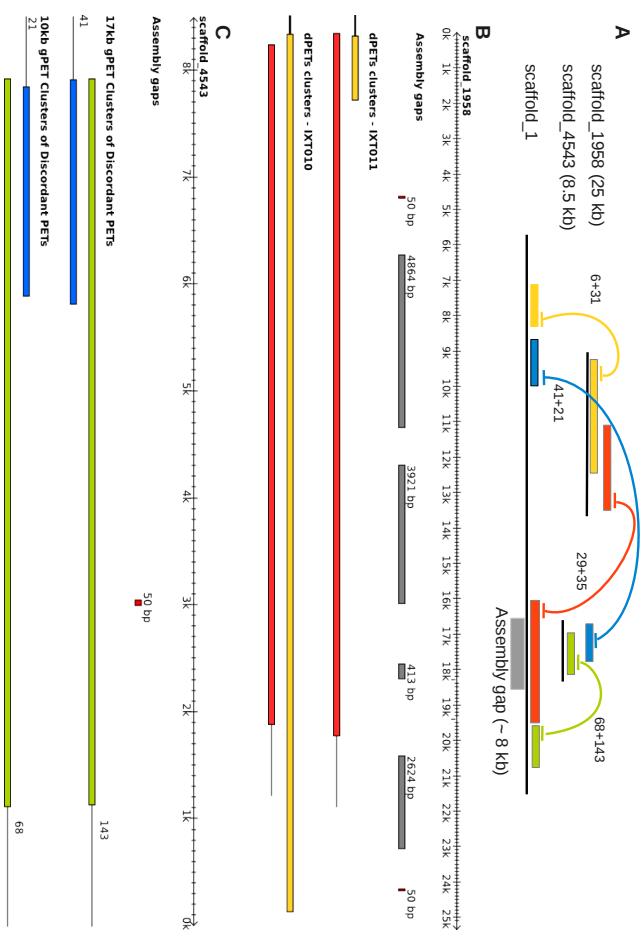
Supplementary Figure 12: Example of assembly gap fill-in by a smaller scaffold.

A. Conceptual representation of the connectivity between scaffolds_1883 and scaffold_2. Numbers above the links indicate the cPET count for each library. Clusters of cPETs connecting the left and the right side are drawn in yellow and orange, respectively. B, C. Detailed view of the entire scaffold_1883 and a sub-region of scaffold_2. The last two tracks correspond to the coverage density of cPET, for each DNA-PET library.



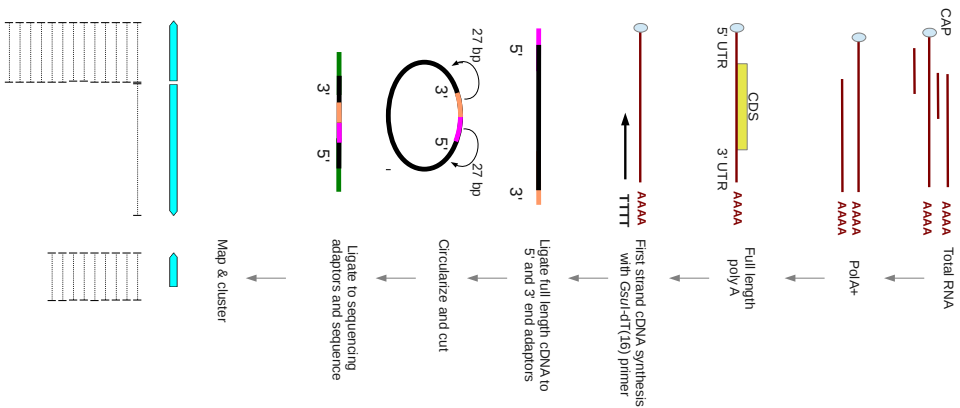
Supplementary Figure 13: Example of assembly gap fill-in by a smaller scaffold.

A. Conceptual representation of the connectivity between scaffolds_12632 and scaffold_11. Numbers above the links indicate the cPET count for each DNA-PET library. Clusters of cPETs connecting the left and the right side are drawn in yellow and orange, respectively. B, C. Detailed view of the entire scaffold_12632 and a subregion of scaffold_11. The last two tracks correspond to the coverage density of cPET, for each DNA-PET library. Note that the ~8 kb assembly gap on scaffold_11 is small compared to the average insert size of the two libraries. As a result, cPET coverage does not drop to zero.



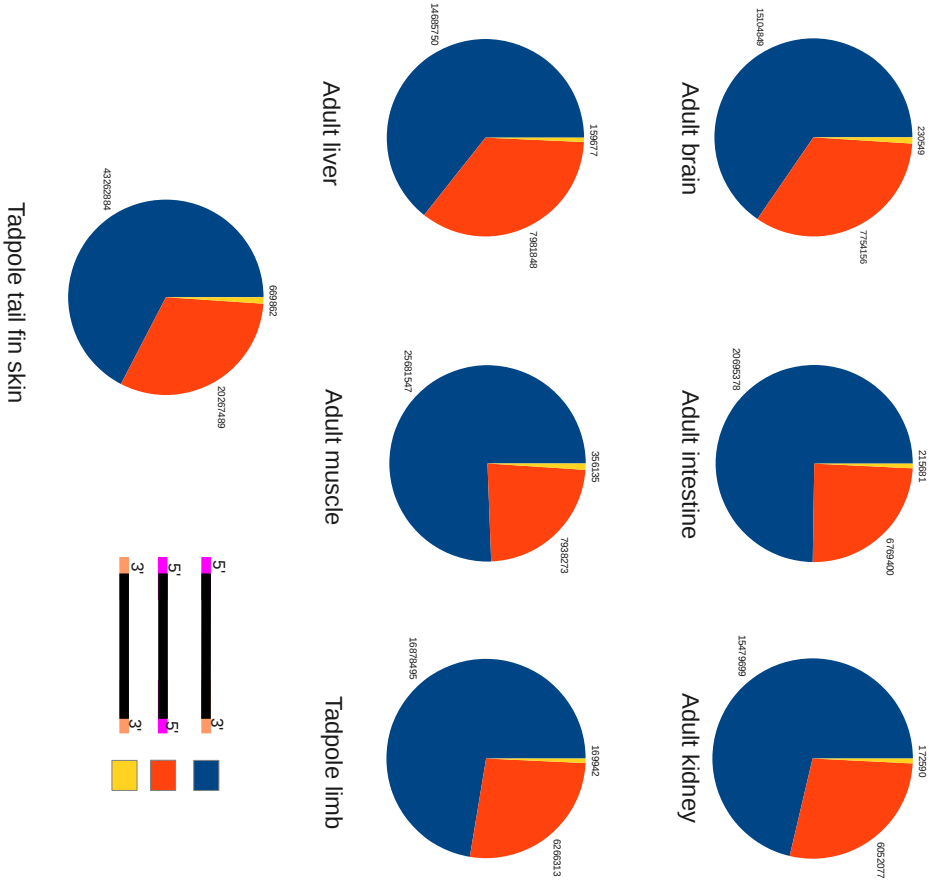
Supplementary Figure 14: Example of complex gap fill-in by smaller scaffolds.

A. Conceptual representation of the connectivity between scaffolds. Numbers above the links indicate the cPET count for each DNA-PET library. Clusters of cPETs connecting the left and the right side of the nested scaffolds are drawn in yellow/blue and orange/green. B, C, D. Detailed view of the nested scaffolds and a sub-region of scaffold_1. The last two tracks correspond to the coverage density of cPET, for each DNA-PET library. Note that the ~8 kb assembly gap on scaffold_11 is small compared to the average insert size of the two libraries. As a result, cPET coverage does not drop to zero.



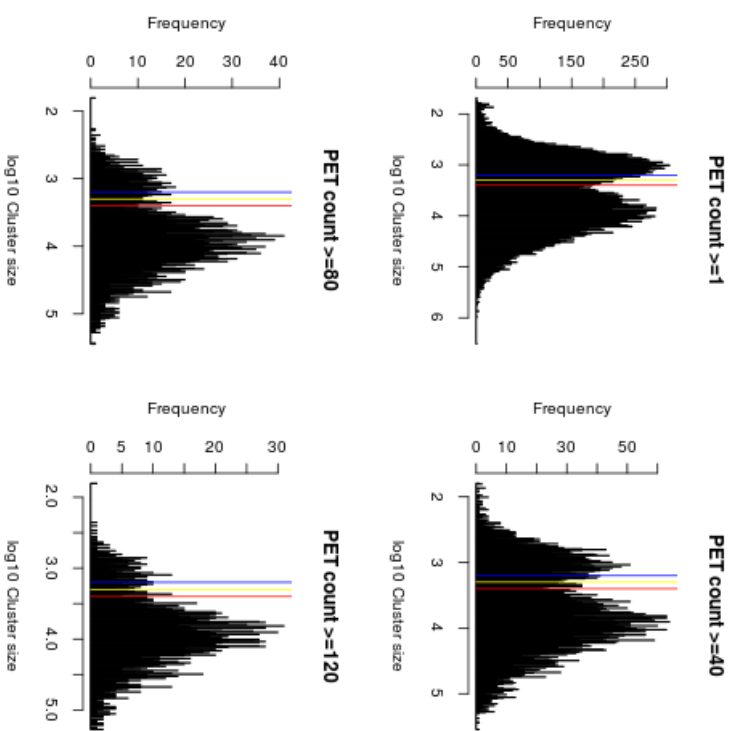
Supplementary Figure 15: Principle of RNA-PET.

Full length poly A+ RNA are used as template to generate full length cDNAs. Double stranded adaptors specific for the 5' and 3' ends (pink, orange) are ligated to the ends of the transcripts. Adaptors contain a EcoPI5I restriction site, cutting 27 bp away from its binding site. After circularization and restriction with EcoPI5I, sequencing adaptors are ligated to the resulting Paired-End dITag, prior to sequencing, mapping and clustering.

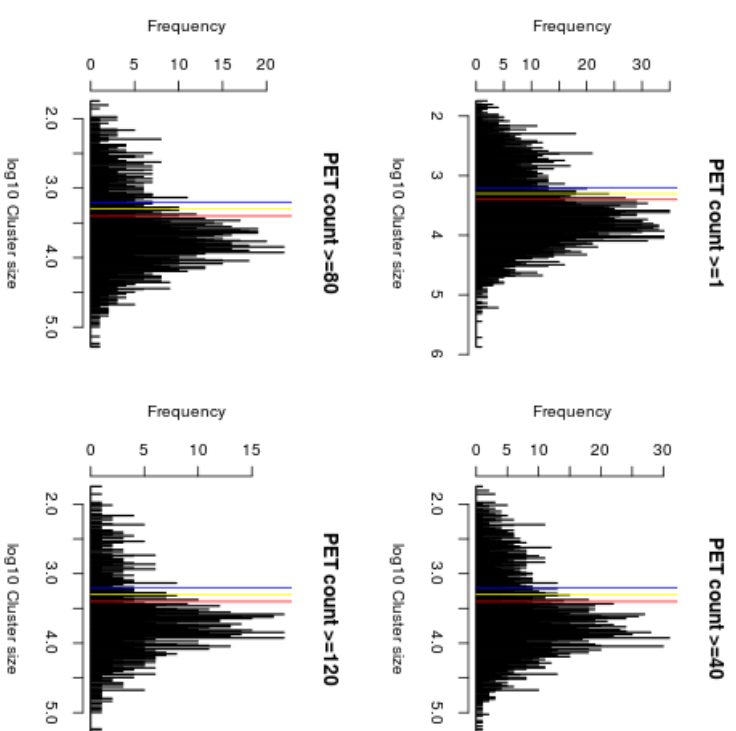


Supplementary Figure 16: Statistics of the identification of the 3'-end signature in RNA-PET di-tags.

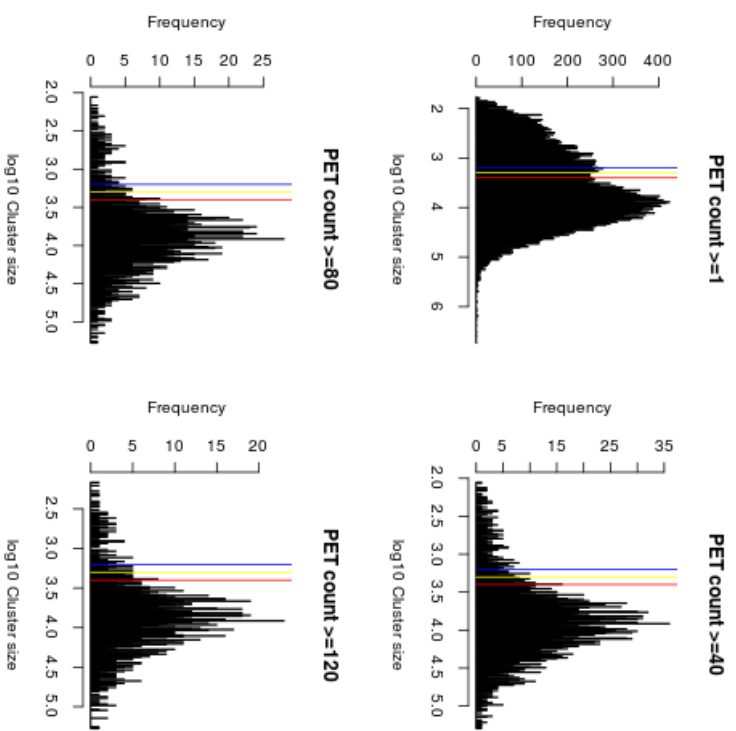
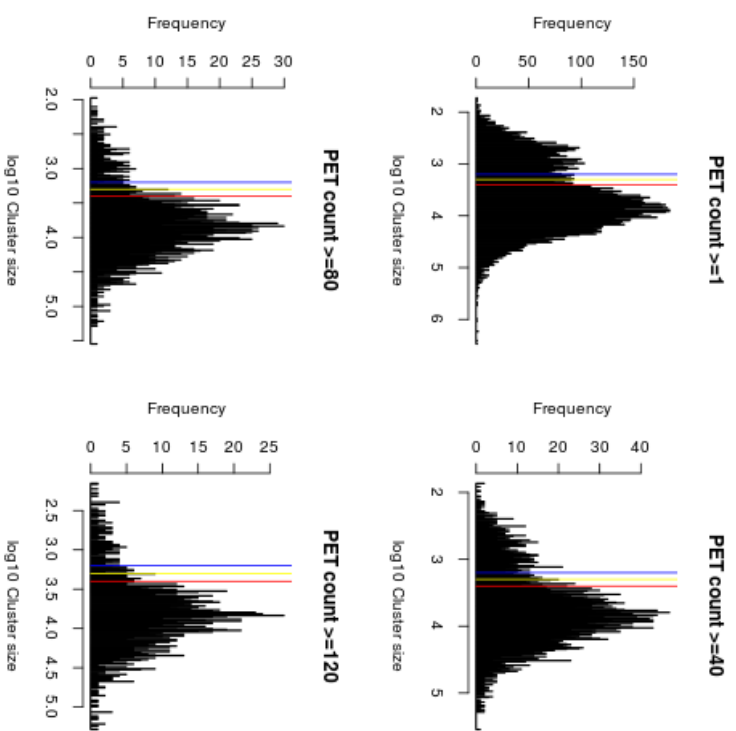
The adaptor at the 3' end of transcripts is labeled with a specific signature (AACTGCTG). RNA-PET di-tags are labeled HT (Head and Tail), TT (Tail Tail) or HH (Head Head) on whether the signature was found at one end, both or none, respectively. Venn diagrams represent the proportion of HT, HH and TT di-tags obtained for each tissue library. Numbers indicate the total number of PETs per category.

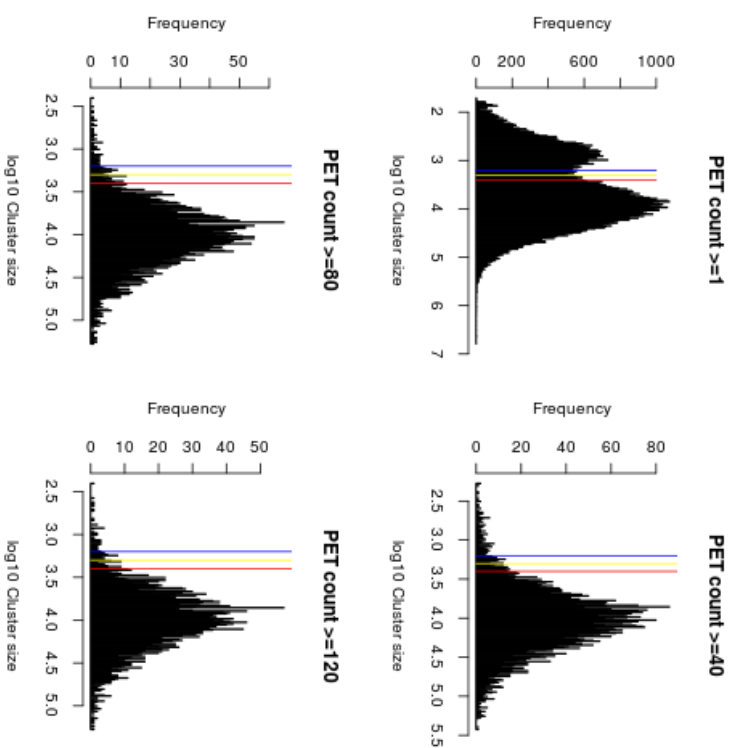


Supplementary Figure 17: Distribution of the genomic span of individual RNA-PET clusters in adult brain.
Blue, yellow and red lines denote ~ 1.5 , ~ 2.0 and ~ 2.5 kb, respectively.

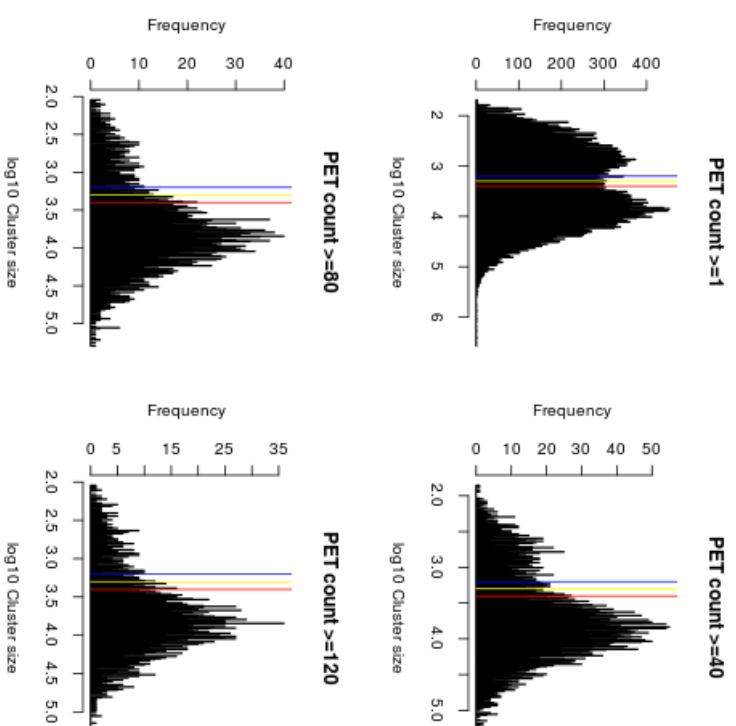


Supplementary Figure 18: Distribution of the genomic span of individual RNA-PET clusters in adult liver.
Blue, yellow and red lines denote ~ 1.5 , ~ 2.0 and ~ 2.5 kb, respectively.

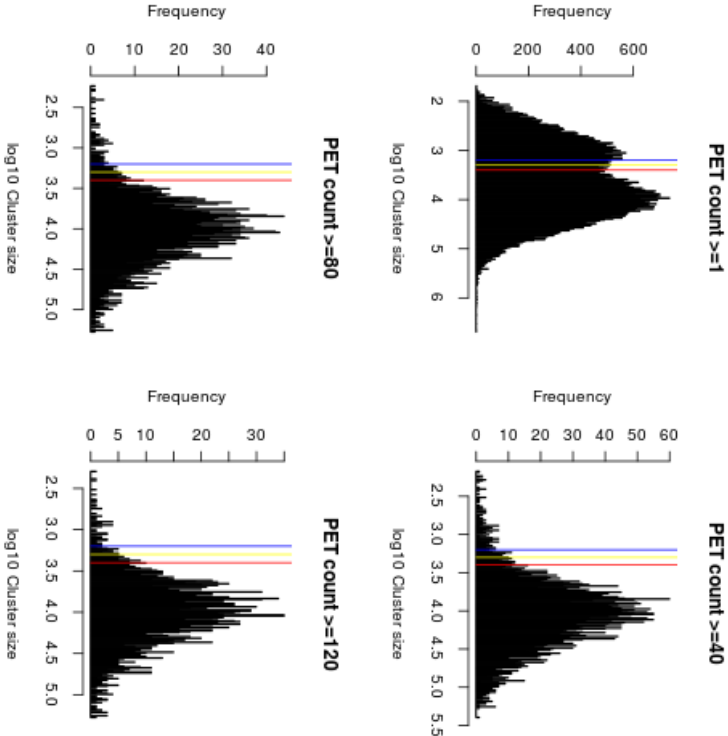




Supplementary Figure 21: Distribution of the genomic span of individual RNA-PET clusters in adult kidney.
Blue, yellow and red lines denote ~1.5, ~2.0 and ~2.5 kb, respectively.



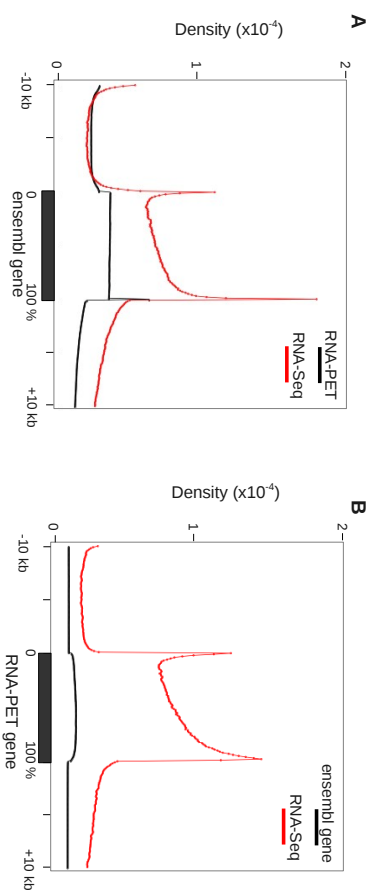
Supplementary Figure 22: Distribution of the genomic span of individual RNA-PET clusters in tadpole tail fin skin.
Blue, yellow and red lines denote ~1.5, ~2.0 and ~2.5 kb, respectively.



Supplementary Figure 23: Distribution of the genomic span of individual RNA-PET clusters in tadpole limbs. Blue, yellow and red lines denote ~1.5, ~2.0 and ~2.5 kb, respectively.

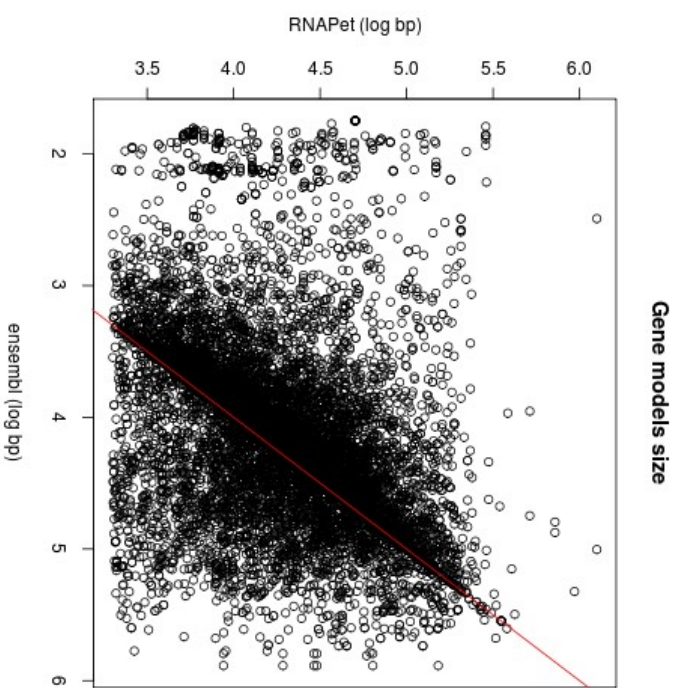
Library	Total sequences	Uniquely mapped PETs	Per cent	Clusters	Filtering
Brain	20799532	7723467	37.1	366523	287331
Intestine	25918053	11569457	44.6	36310	28969
Kidney	20498589	8816384	43.0	300205	236338
Muscle	20998351	6631129	31.6	12503	9444
Liver	22834645	11763691	51.5	27311	2365
Limb	20955120	10184676	48.6	171642	133256
Tail fin skin	24058162	10934696	45.5	83702	63854

Supplementary Figure 24: RNA-PET clustering statistics.



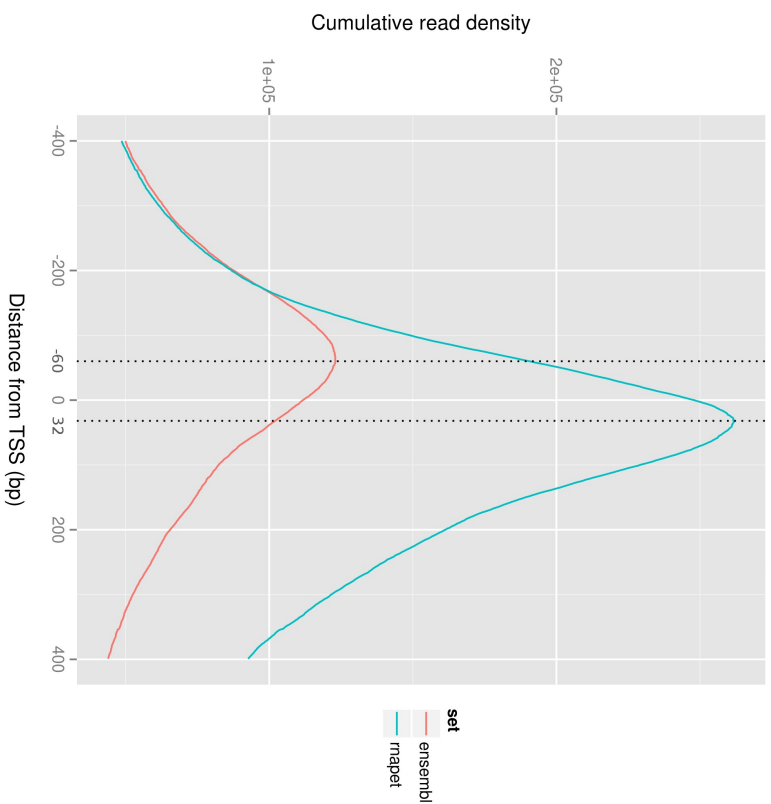
Supplementary Figure 25: RNA-PET significantly extends gene models.

A. Density distribution of RNA-Seq reads and RNA-PET dtags over ensembl gene models. B. Density distribution of RNA-Seq reads and ensembl genes boundaries over RNA-PET based gene models. Gene coverage is expressed in per cent of gene length.



Supplementary Figure 26: RNA-PET significantly extends gene models.

The plot corresponds to the size of individual RNA-PET-based gene models relative to their Ensembl counterpart. Gene models of the same size between the two datasets would follow the red line.



Supplementary Figure 27: Enrichment of RNA-Pol II at the 5' end of gene models improved by RNA-PET.

The RNA-Pol II density was computed at the 5' end of gene models, based on Ensembl and RNA-PET. The 5' end of Ensembl models is located 60 bp downstream of the RNA-Pol II peak (red curve), typically located ~25-45 downstream the TSS. In contrast, the 5' end of models enriched with RNA-PET data extend 32 bp upstream of RNA-Pol II peak.

Liste des abréviations

$\alpha_V\beta_3$ intégrine $\alpha_V\beta_3$.

X. laevis *Xenopus laevis*.

X. tropicalis *Xenopus tropicalis*.

c-erbA homologue cellulaire de l'oncogène du virus de l'érythroblastose aviaire.

v-erbA oncogène du virus de l'érythroblastose aviaire.

11 β -OHase 11 β -hydroxylase.

11- β -HSD1 11- β -hydroxystéroïde déhydrogenase/ Δ -5-4 isomérase, type 1.

11- β -HSD2 11- β -hydroxystéroïde déhydrogenase/ Δ -5-4 isomérase, type 2.

17 α -OH-pregnénolone 17 α -hydroxypregnénolone.

17 α -OH-progestérone 17 α -hydroxyprogestérone.

17 α -OHase 17 α -hydroxylase.

18 β -OHase 18 β -hydroxylase.

21-OHase 21-hydroxylase.

3,3'-T₂ 3,3'-diiodothyronine.

AADAC arylacétamide déacetylase.

ACP analyse en composantes principales.

ACTH adrénocorticotrophine.

ADN acide désoxyribonucléique.

ADNc ADN complémentaire.

AF-1 activation function-1 (domaine d'activation de la transcription ligand-indépendant).

AF-2 activation function-2 (domaine d'activation de la transcription ligand-dépendant).

AP-1 activating protein 1 (protéine activante 1).

APOBEC2 apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2 (apolipoprotéine B enzyme d'édition des ARNm, similaire au polypeptide catalytique 2).

AR récepteur aux androgènes.

ARN acide ribonucléique.

ARN-Pol-II ARN polymérase II.

ARNm ARN messenger.

ARNnc ARN non-codant.

ARNr ARN ribosomal.

ATP adénosine triphosphate.

BNC1 zinc finger protein basonuclin-1 (protéine à doigt de zinc basonucléine-1).

CBG corticosteroid binding globulin (globuline liant les corticostéroïdes).

CBP CREB binding protein (protéine de liaison à CREB).

CD40 CD40, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5 (CD40, membre 5 de la superfamille des récepteurs aux facteurs de nécrose tumorale).

CEBP α CCAAT/enhancer-binding protein α (protéine α de liaison à l'enhanceur/CCAAT).

cGRE élément de réponse composite aux GCs.

ChIA-PET chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing (analyse des interactions de la chromatine par séquençage de tags appariés).

ChIP chromatin immunoprecipitation (immunoprécipitation de chromatine).

ChIP-Seq deep sequencing of chromatin immunoprecipitation products (séquençage massif des produits d'immunoprécipitation de chromatine).

CHX cycloheximide.

CORT corticostérone.

COUP-TF chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (facteur de transcription du promoteur en amont de l'ovalbumine de poulet).

CRH corticolibérine.

CTHBP cytosolic thyroid hormone binding protein (protéine cytosolique liant les hormones thyroïdiennes).

DBD DNA binding domain (domaine de liaison à l'ADN).

DEX dexaméthasone.

DHEA dehydroépiandrostérone.

DIO1 désiodase de type I.

DIO2 désiodase de type II.

DIO3 désiodase de type III.

DIT diiodotyrosine.

DNMT1 DNA methyltransferase 1 (ADN méthyltransférase 1).

DNMT3A DNA methyltransferase 3A (ADN méthyltransférase 3A).

DOC déoxycorticostérone.

DR0 direct repeat separated by 0 bp (répétition en tandem séparée par 0 pb).

DR4 direct repeat separated by 4 bp (répétition en tandem séparée par 4 pb).

ER récepteur aux œstrogènes.

ER6 everted repeat separated by 6 bp (palindrome inversé séparé par 6 pb).

ERK extracellular-signal regulated kinase (kinase régulée par des signaux extracellulaires).

GAS general adaptation syndrome (syndrome d'adaptation générale).

GC glucocorticoïde.

GCNF germ cell nuclear factor (facteur nucléaire des cellules germinales).

GH growth hormone (hormone de croissance).

GO gene ontology (ontologie de gènes).

gPET genomic DNA pair-end tag sequencing (séquençage de tags appariés d'ADN génomique).

GR récepteur aux GCs (glucocorticoïdes).

GR α GR, isoforme α .

GR β GR, isoforme β .

GRE élément de réponse aux GCs.

GRIP1 GR-interacting protein 1 (protéines interagissant avec GR 1).

H3K4 lysine 4 de l'histone H3.

H3K4me1 mono-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3.

H3K4me3 tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3.

HAT histone acétyltransférase.

HDAC histone déacétylase.

HLB hindlimb bud (bourgeon de membre postérieur).

HNF-4 hepatic nuclear factor 4 (facteur nucléaire hépatique 4).

HPA hypothalamo-hypophyso-adrénal.

HPT hypothalamo-hypophyso-thyroïdien.

HSP40 heat-shock protein, 40 kDa (protéine de choc thermique de 40 kDa).

HSP56 heat-shock protein, 56 kDa (protéine de choc thermique de 56 kDa).

HSP70 heat-shock protein, 70 kDa (protéine de choc thermique de 70 kDa).

HSP90 heat-shock protein, 90 kDa (protéine de choc thermique de 90 kDa).

HT hormone thyroïdienne.

I κ B inhibiteur de κ B.

IGF insulin-like growth factor (facteur de croissance similaires à l'insuline).

IL-10 interleukine 10.

INF γ interféron γ .

IR0 inverted repeat separated by 0 bp (palindrome séparé par 0 pb).

IR1 inverted repeat separated by 1 bp (palindrome séparé par 1 pb).

IR3 inverted repeat separated by 3 bp (palindrome séparé par 3 pb).

IRD inner ring deiodination (désiodation du cycle interne).

IRF-3 interferon regulatory factor 3 (facteur de régulation des interférons 3).

IRF-7 interferon regulatory factor 7 (facteur de régulation des interférons 7).

JHDM1D jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D
(homologue D de l'histone déméthylase 1 contenant un domaine jumonji C).

K potassium.

KLF9 krüppel-like factor 9 (facteur similaire à krüppel 9).

KRT17 keratine 17.

LAMB3 laminine $\beta 3$.

LAT L-type amino-acid transporter (transporteur d'acides aminés de type L).

LBD ligand binding domain (domaine de liaison du ligand).

LEPR récepteur à la leptine.

LIG1 ligase 1.

LRH-1 liver receptor homologue-1 (homologue-1 du récepteur hépatique).

MBD methyl-CpG binding domain protein (protéines à domaine de liaison aux
CpG méthylés).

MC minéralocorticoïde.

MCM2 minichromosome maintenance complex component 2 (composant 2 du
complexe de maintenance du minichromosome).

MCM4 minichromosome maintenance complex component 4 (composant 4 du
complexe de maintenance du minichromosome).

MCT monocarboxylate transporter (transporteur d'ions monocarboxylate).

MECP2 methyl CpG binding protein 2 (protéine 2 de liaison aux CpG méthylés).

MeDIP-Seq methylated DNA immunoprecipitation and high-throughput
sequencing (immunoprécipitation d'ADN méthylé et séquençage).

MethylCAP-Seq methylated DNA capture by MBD domain and high-
throughput sequencing (capture d'ADN méthylé à l'aide d'un domaine
MBD et séquençage).

MHC complexe majeur d'histocompatibilité.

MIT monoiodotyrosine.

Mpb méga paire de bases.

MR récepteur aux MCs.

Na sodium.

NCF-1 neutrophil cytosolic factor 1 (facteur cytosolique 1 des neutrophiles).

NCoR nuclear receptors corepressor (Corépresseur des récepteurs nucléaires).

NF- κ B facteur nucléaire κ B.

NGF-1B nerve growth factor 1 B (facteur de croissance nerveuse 1 B).

nGRE élément de réponse négatif aux GCs.

NGS next-generation sequencing (nouvelle technologie de séquençage).

NOR-1 neuron-derived orphan receptor 1 (récepteur orphelin-1 dérivé du neurone).

NTD N-terminal domain (domaine N-terminal).

nTRE élément négatif de réponse aux HTs.

NTRIP6 nuclear TR-interacting protein 6 (protéine nucléaire interagissant avec TR 6).

NURR-1 nuclear receptor related 1 protein (protéine reliée aux récepteurs nucléaires 1).

OATP organic anions transporter polypeptide (polypeptide transporteur d'anions organiques).

ORD outer ring deiodination (désiodation du cycle externe).

P450scc enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol.

pb paire de bases.

PCR polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérase).

PEPCK phosphoénolpyruvate carboxykinase.

PGC-1 α peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator (coactivateur de PPAR γ).

PNPLA2 patatin-like phospholipase domain (phospholipase à domaine patatine).

POMC proopiomélanocortine.

PPAR peroxisome proliferator activated receptor (récepteur activé par les proliférateurs de peroxisomes).

PTEFb positive transcription elongation factor b (facteur positif d'élongation de la transcription b).

RA arthrite rhumatoïde.

RAR récepteur à l'acide 9-*cis*-rétinoïque.

RN récepteur nucléaire.

RNA-PET paired-end tags sequencing of full length RNA (séquençage de tags appariés d'ARN pleine longueur).

RNA-Seq RNA sequencing (séquençage des ARN).

RT-qPCR real time quantitative polymerase chain reaction (réaction en chaîne de polymérase quantitative et en temps réel).

rT₃ 3,3',5'-triiodothyronine.

RXR récepteur à l'acide 9-*cis*-rétinoïque.

SAM S-adénosyl méthionine.

SCEL scieline.

SF-1 steroidogenic factor 1 (facteur stéroïdogénique 1).

SMRT silencing mediator for RAR and TR (médiateur d'extinction de RAR et TR).

SNC système nerveux central.

SNS système nerveux sympathique.

SOCS2 suppressor of cytokine signaling 2 (supresseur de la signalisation des cytokines, 2).

SOLiD sequencing by oligonucleotide ligation and detection (séquençage par ligation et détection d'oligonucléotides).

SRC steroid receptor coactivator (coactivateur des récepteurs aux stéroïdes).

Src Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (proto-oncogènes codant pour des tyrosine kinases Src).

stade NF stade Nieukoop-Faber.

STAT-5 signal transducer and activator of transcription 5 (transducteur du signal et activateur de la transcription 5).

SWI/SNF "SWItch/Sucrose NonFermentable".

T₃ 3,5,3'-triiodothyronine.

T₄ thyroxine.

TBG thyroxine binding globin (globine liant la thyroxine).

TBP TATA-box binding protein (protéine de liaison aux boîtes TATA).

TDRD9 tudor domain containing 9 (protéine 9 contenant un domaine TUDOR).

TETRAC acide tetraidothyroacétique.

TF tailfin (épiderme caudal).

TH/bZIP thyroid hormone induced basic leucine zipper transcription factor (facteur de transcription avec une glissière à leucine basique induit par les HTs).

TNC tenascin C.

TNF α tumor necrosis factor α (facteur α de nécrose tumorale).

TR récepteur aux HTs.

TR α TR, type α .

TR β TR, type β .

TR $\Delta\alpha$ TR, type α forme Δ .

TR $\Delta\beta$ TR, type β forme Δ .

TRE élément de réponse aux HTs.

TRH thyrolibérine.

TSH thyroestimuline hypophysaire.

TSS transcription start site (site d'initiation de la transcription).

TTR transthyrétine.

TTS transcription terminaison site (site de terminaison de la transcription).

UHRF1 ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1 (protéine 1 semblable à l'ubiquitine avec des domaines PHD et en doigt "RING").

VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1 (molécule 1 d'adhésion des cellules vasculaires).

VDR récepteur à la vitamine D.

ZNF750 zinc finger protein 750 (protéine à doigt de zinc 750).

Bibliographie

- ABEL, E. D., BOERS, M. E., PAZOS-MOURA, C., MOURA, E., KAULBACH, H., ZAKARIA, M., LOWELL, B., RADOVICK, S., LIBERMAN, M. C. et WONDISFORD, F. (1999). Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. *The Journal of clinical investigation*, 104(3):291–300.
- ABU, E. O., HORNER, A., TETI, A., CHATTERJEE, V. K. et COMPSTON, J. E. (2000). The localization of thyroid hormone receptor mRNAs in human bone. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 10(4):287–93.
- ADAMS, M., MEIJER, O. C., WANG, J., BHARGAVA, A. et PEARCE, D. (2003). Homodimerization of the glucocorticoid receptor is not essential for response element binding : activation of the phenylethanolamine N-methyltransferase gene by dimerization-defective mutants. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(12):2583–92.
- AMAYA, E. (2005). Xenomics. *Genome research*, 15(12):1683–91.
- AMIR, R. E., VAN DEN VEYVER, I. B., WAN, M., TRAN, C. Q., FRANCKE, U. et ZOGHBI, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature genetics*, 23(2):185–8.
- ANDERS, S. et HUBER, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10):R106.
- ANDERS, S., MCCARTHY, D. J., CHEN, Y., OKONIEWSKI, M., SMYTH, G. K., HUBER, W. et ROBINSON, M. D. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature protocols*, 8(9):1765–86.
- ANGELIER, F. et WINGFIELD, J. C. (2013). Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world : Theory, hypotheses and perspectives. *General and comparative endocrinology*, 190:118–28.
- ARANDA, a. et PASCUAL, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*, 81(3):1269–304.
- ARRIZA, J. L., WEINBERGER, C., CERELLI, G., GLASER, T. M., HANDELIN, B. L., HOUSMAN, D. E. et EVANS, R. M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA : structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4812):268–75.
- AUPHAN, N., DiDONATO, J. A., ROSETTE, C., HELMBERG, A. et KARIN, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids : inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5234):286–90.
- AZIZ, M. M., ISHIHARA, S., MISHIMA, Y., OSHIMA, N., MORIYAMA, I., YUKI, T., KADOWAKI, Y., RUMI, M. A. K., AMANO, Y. et KINOSHITA, Y. (2009). MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11):7222–32.
- BAGAMASBAD, P., HOWDESHELL, K. L., SACHS, L. M., DEMENEIX, B. a. et DENVER, R. J. (2008). A role for basic transcription element-binding protein 1 (BTEB1) in the autoinduction of thyroid hormone receptor beta. *The Journal of biological chemistry*, 283(4):2275–85.
- BAGAMASBAD, P., ZIERA, T., BORDEN, S. a., BONETT, R. M., ROZEBOOM, A. M., SEASHOLTZ, A. et DENVER, R. J. (2012). Molecular basis for glucocorticoid induction of the Kruppel-like factor 9 gene in hippocampal neurons. *Endocrinology*, 153(11):5334–45.

- BAIN, D. L., HENEGHAN, A. F., CONNAGHAN-JONES, K. D. et MIURA, M. T. (2007). Nuclear receptor structure : implications for function. *Annual review of physiology*, 69:201–20.
- BARETTINO, D., VIVANCO RUIZ, M. M. et STUNNENBERG, H. G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *The EMBO journal*, 13(13):3039–49.
- BARNES, S. K. et OZANNE, S. E. (2011). Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Progress in biophysics and molecular biology*, 106(1):323–36.
- BARTHOLOME, B., SPIES, C. M., GABER, T., SCHUCHMANN, S., BERKI, T., KUNKEL, D., BIENERT, M., RADBRUCH, A., BURMESTER, G.-R., LAUSTER, R., SCHEFFOLD, A. et BUTTGEREIT, F. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(1):70–80.
- BASSETT, J. H. D. et WILLIAMS, G. R. (2009). The skeletal phenotypes of TRalpha and TRbeta mutant mice. *Journal of molecular endocrinology*, 42(4):269–82.
- BAULIEU, E. E. (1987). Steroid hormone antagonists at the receptor level : a role for the heat-shock protein MW 90,000 (hsp 90). *Journal of cellular biochemistry*, 35(2):161–74.
- BAUMANN, F. (1896). Ueber das normale Vorkommen von Jod im Thierkörper. *Z. Phys. Chem.*, 21:319–330.
- BAXTER, J. D., ROUSSEAU, G. G., BENSON, M. C., GARCEA, R. L., ITO, J. et TOMKINS, G. M. (1972). Role of DNA and specific cytoplasmic receptors in glucocorticoid action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(7):1892–6.
- BAXTER, J. D. et TOMKINS, G. M. (1971). Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(5):932–7.
- BECKER, K. L., BREMNER, W. J., BILEZIKIAN, J. P. et HUNG, W. (2001). *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins.
- BEGUM, G., DAVIES, A., STEVENS, A., OLIVER, M., JAQUIERY, A., CHALLIS, J., HARDING, J., BLOOMFIELD, F. et WHITE, A. (2013). Maternal undernutrition programs tissue-specific epigenetic changes in the glucocorticoid receptor in adult offspring. *Endocrinology*, 154(12):4560–9.
- BERGH, J. J., LIN, H.-Y., LANSING, L., MOHAMED, S. N., DAVIS, F. B., MOUSA, S. et DAVIS, P. J. (2005). Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146(7):2864–71.
- BERTRAND, C., BLANCHET, E., PESSEMESE, L., ANNICOTTE, J. S., FEILLET-COUDRAY, C., CHABI, B., LEVIN, J., FAJAS, L., CABELLO, G., WRUTNIAK-CABELLO, C. et CASAS, F. (2013). Mice lacking the p43 mitochondrial T3 receptor become glucose intolerant and insulin resistant during aging. *PloS one*, 8(9):e75111.
- BIANCO, A. C. et KIM, B. W. (2006). Deiodinases : implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*, 116(10):2571–9.
- BIANCO, A. C., MAIA, A. L., da SILVA, W. S. et CHRISTOFFOLETE, M. A. (2005). Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Bioscience reports*, 25(3-4):191–208.
- BIANCO, A. C., NUNES, M. T., HELL, N. S. et MACIEL, R. M. (1987). The role of glucocorticoids in the stress-induced reduction of extrathyroidal 3,5,3'-triiodothyronine generation in rats. *Endocrinology*, 120(3):1033–8.
- BILESIMO, P., JOLIVET, P., ALFAMA, G., BUISINE, N., LE MEVEL, S., HAVIS, E., DEMENEIX, B. a. et SACHS, L. M. (2011). Specific histone lysine 4 methylation patterns define TR-binding capacity and differentiate direct T3 responses. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(2):225–37.
- BILLAS, I. et MORAS, D. (2013). Allosteric controls of nuclear receptor function in the regulation of transcription. *Journal of molecular biology*, 425(13):2317–29.
- BITTAR, E. E. et BITTAR, N. (1997). *Molecular and cellular endocrinology*. Greenwich, Conn. : JAI Press.
- BLEDSON, R. K., MONTANA, V. G., STANLEY, T. B., DELVES, C. J., APOLITO, C. J., MCKEE, D. D., CONSLER, T. G., PARKS, D. J., STEWART, E. L., WILLSON, T. M., LAMBERT, M. H., MOORE, J. T., PEARCE, K. H. et XU, H. E. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid

- receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, 110(1):93–105.
- BOELAERT, K. et FRANKLYN, J. A. (2005). Thyroid hormone in health and disease. *The Journal of endocrinology*, 187(1):1–15.
- BOLT, R. J., van WEISSENBRUCH, M. M., LAFEVER, H. N. et DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatric pulmonology*, 32(1):76–91.
- BONETT, R. M., HOOPFER, E. D. et DENVER, R. J. (2010). Molecular mechanisms of corticosteroid synergy with thyroid hormone during tadpole metamorphosis. *General and comparative endocrinology*, 168(2):209–19.
- BONETT, R. M., HU, F., BAGAMASBAD, P. et DENVER, R. J. (2009). Stressor and glucocorticoid-dependent induction of the immediate early gene *kruppel-like factor 9* : implications for neural development and plasticity. *Endocrinology*, 150(4):1757–65.
- BOSTICK, M., KIM, J. K., ESTÈVE, P.-O., CLARK, A., PRADHAN, S. et JACOBSEN, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science (New York, N. Y.)*, 317(5845):1760–4.
- BRAUN, T., CHALLIS, J. R., NEWNHAM, J. P. et SLOBODA, D. M. (2013). Early-life glucocorticoid exposure : the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocrine reviews*, 34(6):885–916.
- BRIX, K., FÜHRER, D. et BIEBERMANN, H. (2011). Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid research*, 4 Suppl 1:S9.
- BUCHHOLZ, D. R., HSIA, S.-C. V., FU, L. et SHI, Y.-b. (2003). A dominant-negative thyroid hormone receptor blocks amphibian metamorphosis by retaining corepressors at target genes. *Molecular and cellular biology*, 23(19):6750–8.
- BUCHHOLZ, D. R., TOMITA, A., FU, L., PAUL, B. D. et SHI, Y.-B. (2004). Transgenic analysis reveals that thyroid hormone receptor is sufficient to mediate the thyroid hormone signal in frog metamorphosis. *Molecular and cellular biology*, 24(20):9026–37.
- BUCKBINDER, L. et BROWN, D. D. (1992). Thyroid hormone-induced gene expression changes in the developing frog limb. *The Journal of biological chemistry*, 267(36):25786–91.
- BUSILLO, J. M. et CIDLOWSKI, J. a. (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation : ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in endocrinology and metabolism : TEM*, 24(3):109–19.
- BUTTGEREIT, F. et SCHEFFOLD, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, 67(6):529–34.
- CANNON, W. B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage, an account of recent researches into the function of emotional excitement*. New York and London, D. Appleton and Co.
- CARBONE, D. L., ZULOAGA, D. G., LACAGNINA, A. F., MCGIVERN, R. F. et HANDA, R. J. (2012). Exposure to dexamethasone during late gestation causes female-specific decreases in core body temperature and prepro-thyrotropin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Physiology & behavior*, 108:6–12.
- CARTER, B. S., MENG, F. et THOMPSON, R. C. (2012). Glucocorticoid treatment of astrocytes results in temporally dynamic transcriptome regulation and astrocyte-enriched mRNA changes in vitro. *Physiological genomics*, 44(24):1188–200.
- CAYROU, C., DENVER, R. J. et PUYMIRAT, J. (2002). Suppression of the basic transcription element-binding protein in brain neuronal cultures inhibits thyroid hormone-induced neurite branching. *Endocrinology*, 143(6):2242–9.
- CHALLIS, J., SLOBODA, D., MATTHEWS, S., HOLLOWAY, A., ALFAIDY, N., HOWE, D., FRASER, M. et NEWNHAM, J. (2000). Fetal hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. *Endocrine research*, 26(4):489–504.
- CHANDLER, V. L., MALER, B. a. et YAMAMOTO, K. R. (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell*, 33(2):489–99.
- CHARLTON, B. G. (1990). Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *The Journal of endocrinology*, 126(1):5–8.

- CHARMANDARI, E., CHROUSOS, G. P., ICHIJO, T., BHATTACHARYYA, N., VOTTERO, A., SOUVATZOGLOU, E. et KINO, T. (2005). The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(1):52–64.
- CHASSANDE, O., FRAICHARD, a., GAUTHIER, K., FLAMANT, F., LEGRAND, C., SAVATIER, P., LAUDET, V. et SAMARUT, J. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(9):1278–90.
- CHATONNET, F., GUYOT, R., BENOÎT, G. et FLAMANT, F. (2013). Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8):E766–75.
- CHATONNET, F., PICOU, F., FAUQUIER, T. et FLAMANT, F. (2011). Thyroid hormone action in cerebellum and cerebral cortex development. *Journal of thyroid research*, 2011:145762.
- CHEN, K.-C., BLALOCK, E. M., CURRAN-RAUHUT, M. A., KADISH, I., BLALOCK, S. J., BREWER, L., PORTER, N. M. et LANDFIELD, P. W. (2013). Glucocorticoid-dependent hippocampal transcriptome in male rats : pathway-specific alterations with aging. *Endocrinology*, 154(8):2807–20.
- CHEN, S. y., WANG, J., YU, G. q., LIU, W. et PEARCE, D. (1997). Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*, 272(22):14087–92.
- CHEN, Z.-P. et HETZEL, B. S. (2010). Cretinism revisited. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 24(1):39–50.
- CHENG, S.-Y., LEONARD, J. L. et DAVIS, P. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews*, 31(2):139–70.
- CHOPRA, I. J., WILLIAMS, D. E., ORGIAZZI, J. et SOLOMON, D. H. (1975). Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 41(5):911–20.
- CHRISTENSEN, H., HESS, B. et RIGGS, T. (1954). Concentration of Taurine, β -Alanine, and Triiodothyronine by Ascites Carcinoma Cells. *Cancer research*, pages 124–127.
- CHUNG, B. C., MATTESON, K. J., VOUTILAINEN, R., MOHANDAS, T. K. et MILLER, W. L. (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc : cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(23):8962–6.
- CLEVER, U. et KARLSON, P. (1960). Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone. *Experimental cell research*, 20:623–6.
- CLIFTON, V. L. (2005). Sexually dimorphic effects of maternal asthma during pregnancy on placental glucocorticoid metabolism and fetal growth. *Cell and tissue research*, 322(1):63–71.
- COCKREM, J. F. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and comparative endocrinology*, 181:45–58.
- COLE, T. J., MYLES, K., PURTON, J. F., BRERETON, P. S., SOLOMON, N. M., GODFREY, D. I. et FUNDER, J. W. (2001). GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant. *Molecular and cellular endocrinology*, 173(1-2):193–202.
- COMMITTEE, N. R. N. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97(2):161–3.
- COOPER, R. A. (1978). Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *Journal of supramolecular structure*, 8(4):413–30.
- CRESPI, E. J., WILLIAMS, T. D., JESSOP, T. S. et DELEHANTY, B. (2013). Life history and the ecology of stress : how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals? *Functional Ecology*, 27(1):93–106.
- CROXTALL, J. D., CHOUDHURY, Q. et FLOWER, R. J. (2000). Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *British journal of pharmacology*, 130(2):289–98.
- CRUDO, A., PETROPOULOS, S., MOISIADIS, V. G., IQBAL, M., KOSTAKI, A., MACHNES, Z., SZYF, M. et MATTHEWS, S. G. (2012). Prenatal synthetic glucocorticoid treatment changes

- DNA methylation states in male organ systems : multigenerational effects. *Endocrinology*, 153(7):3269–83.
- DARRAS, V. M., KOTANEN, S. P., GERIS, K. L., BERGHMAN, L. R. et KÜHN, E. R. (1996). Plasma thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activity following an acute glucocorticoid challenge in embryonic compared with posthatch chickens. *General and comparative endocrinology*, 104(2):203–12.
- DAS, B., CAI, L., CARTER, M. G., PIAO, Y.-L., SHAROV, A. a., KO, M. S. H. et BROWN, D. D. (2006). Gene expression changes at metamorphosis induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis* tadpoles. *Developmental biology*, 291(2):342–55.
- DAS, B., HEIMEIER, R. a., BUCHHOLZ, D. R. et SHI, Y.-B. (2009). Identification of direct thyroid hormone response genes reveals the earliest gene regulation programs during frog metamorphosis. *The Journal of biological chemistry*, 284(49):34167–78.
- DAS, B., MATSUDA, H., FUJIMOTO, K., SUN, G., MATSUURA, K. et SHI, Y.-B. (2010). Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *General and comparative endocrinology*, 168(2):174–80.
- DATSON, N. A., van der PERK, J., de KLOET, E. R. et VREUGDENHIL, E. (2001). Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *The European journal of neuroscience*, 14(4):675–89.
- DAVIS, E. P., SANDMAN, C. A., BUSS, C., WING, D. A. et HEAD, K. (2013). Fetal glucocorticoid exposure is associated with preadolescent brain development. *Biological psychiatry*, 74(9):647–55.
- DAVIS, P. J. et DAVIS, F. B. (2002). Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 12(6):459–66.
- DAVIS, P. J., DAVIS, F. B. et CODY, V. (2005). Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends in endocrinology and metabolism : TEM*, 16(9):429–35.
- DAVIS, P. J., DAVIS, F. B., MOUSA, S. A., LUIDENS, M. K. et LIN, H.-Y. (2011). Membrane receptor for thyroid hormone : physiologic and pharmacologic implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51:99–115.
- DAVIS, P. J., LEONARD, J. L. et DAVIS, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2):211–8.
- DAVIS, P. J., SHIH, a., LIN, H. Y., MARTINO, L. J. et DAVIS, F. B. (2000). Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *The Journal of biological chemistry*, 275(48):38032–9.
- DE, K., GHOSH, G., DATTA, M., KONAR, A., BANDYOPADHYAY, J., BANDYOPADHYAY, D., BHATTACHARYA, S. et BANDYOPADHYAY, A. (2004). Analysis of differentially expressed genes in hyperthyroid-induced hypertrophied heart by cDNA microarray. *The Journal of endocrinology*, 182(2):303–14.
- DE BOSSCHER, K., VANDEN BERGHE, W. et HAEGEMAN, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1 : molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews*, 24(4):488–522.
- de MAGALHÃES, J. a. P., COSTA, J. et TOUSSAINT, O. (2005). HAGR : the Human Ageing Genomic Resources. *Nucleic acids research*, 33(Database issue):D537–43.
- DECUYPERE, E., SCANES, C. G. et KÜHN, E. R. (1983). Effects of glucocorticoids on circulating concentrations of thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) and on peripheral monodeiodination in pre- and post-hatching chickens. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 15(5):233–6.
- DELANGE, F. (1994). The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 4(1):107–28.
- DENVER, R. J. (1993). Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides. *General and comparative endocrinology*, 91(1):38–51.
- DENVER, R. J. (1997). Environmental stress as a developmental cue : corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and behavior*, 31(2):169–79.
- DENVER, R. J. (2009). Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *General and comparative endocrinology*, 164(1):20–31.

- DENVER, R. J., HU, F., SCANLAN, T. S. et FURLOW, J. D. (2009). Thyroid hormone receptor subtype specificity for hormone-dependent neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Developmental biology*, 326(1):155–68.
- DENVER, R. J., OUELLET, L., FURLING, D., KOBAYASHI, A., FUJII-KURIYAMA, Y. et PUYMIRAT, J. (1999). Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. Evidence for a role in neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry*, 274(33):23128–34.
- DENVER, R. J. et WILLIAMSON, K. E. (2009). Identification of a thyroid hormone response element in the mouse Kruppel-like factor 9 gene to explain its postnatal expression in the brain. *Endocrinology*, 150(8):3935–43.
- DIAMOND, M. I., MINER, J. N., YOSHINAGA, S. K. et YAMAMOTO, K. R. (1990). Transcription factor interactions : selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4974):1266–72.
- DICKMEIS, T. (2009). Glucocorticoids and the circadian clock. *The Journal of endocrinology*, 200(1):3–22.
- DIETRICH, S. W., BOLGER, M. B., KOLLMAN, P. A. et JORGENSEN, E. C. (1977). Thyroxine analogues. 23. Quantitative structure-activity correlation studies of in vivo and in vitro thyromimetic activities. *Journal of medicinal chemistry*, 20(7):863–80.
- DOSTERT, a. et HEINZEL, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Current pharmaceutical design*, 10(23):2807–16.
- DRAKE, A. J., MCPHERSON, R. C., GODFREY, K. M., COOPER, C., LILLYCROP, K. A., HANSON, M. A., MEEHAN, R. R., SECKL, J. R. et REYNOLDS, R. M. (2012). An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth. *Clinical endocrinology*, 77(6):808–15.
- DROUIN, J., SUN, Y. L., CHAMBERLAND, M., GAUTHIER, Y., DE LÉAN, a., NEMER, M. et SCHMIDT, T. J. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *The EMBO journal*, 12(1):145–56.
- DU PASQUIER, L., SCHWAGER, J. et FLAJNIK, M. F. (1989). The immune system of *Xenopus*. *Annual review of immunology*, 7:251–75.
- DUPRÉ, S. M., GUISSOUMA, H., FLAMANT, F., SEUGNET, I., SCANLAN, T. S., BAXTER, J. D., SAMARUT, J., DEMENEIX, B. A. et BECKER, N. (2004). Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 145(5):2337–45.
- EDEN, E., NAVON, R., STEINFELD, I., LIPSON, D. et YAKHINI, Z. (2009). GOrilla : a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC bioinformatics*, 10:48.
- EDWARDS, C. R., STEWART, P. M., BURT, D., BRETT, L., MCINTYRE, M. A., SUTANTO, W. S., de KLOET, E. R. et MONDER, C. (1988). Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 2(8618):986–9.
- EIGLER, N., SACCA, L. et SHERWIN, R. S. (1979). Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog : a model for stress-induced hyperglycemia. *The Journal of clinical investigation*, 63(1):114–23.
- EKINS, R. P., SINHA, A. K., PICKARD, M. R., EVANS, I. M. et al YATAMA, F. (1994). Transport of thyroid hormones to target tissues. *Acta medica Austriaca*, 21(2):26–34.
- ELGUETA, R., BENSON, M. J., de VRIES, V. C., WASIUK, A., GUO, Y. et NOELLE, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological reviews*, 229(1):152–72.
- ENRÍQUEZ, J. A., FERNÁNDEZ-SILVA, P., GARRIDO-PÉREZ, N., LÓPEZ-PÉREZ, M. J., PÉREZ-MARTOS, A. et MONTOYA, J. (1999). Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Molecular and cellular biology*, 19(1):657–70.
- ERIKSSON, P. et WRANGE, O. (1990). Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer influence its DNA binding properties. *The Journal of biological chemistry*, 265(6):3535–42.
- ESCRIVA, H., BERTRAND, S., GERMAIN, P., ROBINSON-RECHAVI, M., UMBHAUER, M., CARTRY, J., DUFFRAISSE, M., HOLLAND, L., GRONEMEYER, H. et LAUDET, V. (2006). Neofunctionalization in vertebrates : the example of retinoic acid receptors. *PLoS genetics*, 2(7):e102.
- EVANS, R. M. et HOLLENBERG, S. M. (1988). Zinc fingers : gilt by association. *Cell*, 52(1):1–3.

- EXTON, J. H. (1987). Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes/metabolism reviews*, 3(1):163–83.
- FAVRE-YOUNG, H., DIF, F., ROUSSILLE, F., DEMENEIX, B. A., KELLY, P. A., EDERY, M. et de LUZE, A. (2000). Cross-talk between signal transducer and activator of transcription (Stat5) and thyroid hormone receptor-beta 1 (TRbeta1) signaling pathways. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(9):1411–24.
- FENG, X., JIANG, Y., MELTZER, P. et YEN, P. M. (2000). Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(7):947–55.
- FERACO, A., ARMANI, A., MAMMI, C., FABBRI, A., ROSANO, G. M. C. et CAPRIO, M. (2013). Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 137:99–106.
- FIGUEIRA, A. C. M., LIMA, L. M. T. R., LIMA, L. H. F., RANZANI, A. T., MULE, G. D. S. et POLIKARPOV, I. (2010). Recognition by the thyroid hormone receptor of canonical DNA response elements. *Biochemistry*, 49(5):893–904.
- FLAJNIK, M. F., HSU, E., KAUFMAN, J. F. et PASQUIER, L. D. (1987). Changes in the immune system during metamorphosis of *Xenopus*. *Immunology Today*, 8(2):58–64.
- FLAMANT, F. et SAMARUT, J. (2003). Thyroid hormone receptors : lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in endocrinology and metabolism : TEM*, 14(2):85–90.
- FOREST, M. G. (2004). Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human reproduction update*, 10(6):469–85.
- FRANK, M. G., THOMPSON, B. M., WATKINS, L. R. et MAIER, S. F. (2012). Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain, behavior, and immunity*, 26(2):337–45.
- FRIESEMA, E. C. H., GANGULY, S., ABDALLA, A., MANNING FOX, J. E., HALESTRAP, A. P. et VISSER, T. J. (2003). Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of biological chemistry*, 278(41):40128–35.
- FRIESEMA, E. C. H., JANSEN, J., JACHTENBERG, J.-w., VISSER, W. E., KESTER, M. H. a. et VISSER, T. J. (2008). Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(6):1357–69.
- FRYER, C. J. et ARCHER, T. K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, 393(6680):88–91.
- FU, L., HASEBE, T., ISHIZUYA-OKA, A. et SHI, Y.-B. (2007). Roles of Matrix Metalloproteinases and ECM Remodeling during Thyroid Hormone-Dependent Intestinal Metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Organogenesis*, 3(1):14–9.
- FUJII, S.-I., LIU, K., SMITH, C., BONITO, A. J. et STEINMAN, R. M. (2004). The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *The Journal of experimental medicine*, 199(12):1607–18.
- FUKS, F., HURD, P. J., WOLF, D., NAN, X., BIRD, A. P. et KOUZARIDES, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *The Journal of biological chemistry*, 278(6):4035–40.
- FUNDER, J. W., FELDMAN, D. et EDELMAN, I. S. (1973). The roles of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology*, 92(4):994–1004.
- FUNDER, J. W., PEARCE, P. T., SMITH, R. et SMITH, a. I. (1988). Mineralocorticoid action : target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science (New York, N. Y.)*, 242(4878):583–5.
- FURLOW, J. D. et KANAMORI, A. (2002). The transcription factor basic transcription element-binding protein 1 is a direct thyroid hormone response gene in the frog *Xenopus laevis*. *Endocrinology*, 143(9):3295–305.
- FURLOW, J. D. et NEFF, E. S. (2006). A developmental switch induced by thyroid hormone : *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends in endocrinology and metabolism : TEM*, 17(2):40–7.
- GALLIHER-BECKLEY, A. J. et CIDLOWSKI, J. a. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB life*, 61(10):979–86.
- GALTON, V. a. (1989). The role of 3,5,3'-triiodothyronine in the physiological action of thyroxine in the premetamorphic tadpole. *Endocrinology*, 124(5):2427–33.

- GALTON, V. A. (1990). Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone. *Endocrinology*, 127(6):2997–3002.
- GAMETCHU, B., CHEN, F., SACKKEY, F., POWELL, C. et WATSON, C. S. (1999). Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids*, 64(1-2):107–19.
- GARSTKA, H. L., FÄCKE, M., ESCRIBANO, J. R. et WIESNER, R. J. (1994). Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochemical and biophysical research communications*, 200(1):619–26.
- GESINA, E., TRONCHE, F., HERRERA, P., DUCHENE, B., TALES, W., CZERNICHOW, P. et BREANT, B. (2004). Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes*, 53(9):2322–9.
- GHAYEE, H. K. et AUCHUS, R. J. (2007). Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 8(4):289–300.
- GIGUÈRE, V. (1999). Orphan nuclear receptors : from gene to function. *Endocrine reviews*, 20(5):689–725.
- GIL-IBÁÑEZ, P., BERNAL, J. et MORTE, B. (2014). Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells : role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic Acid and glucocorticoids. *PloS one*, 9(3):e91692.
- GILCHRIST, M. J. et POLLET, N. (2012). Databases of gene expression in *Xenopus* development. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 917:319–45.
- GODOWSKI, P. J., RUSCONI, S., MIESFELD, R. et YAMAMOTO, K. R. (1987). Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature*, 325(6102):365–8.
- GOMEZ-MESTRE, I., KULKARNI, S. et BUCHHOLZ, D. R. (2013). Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PloS one*, 8(12):e84266.
- GOMEZ-MESTRE, I., SACCOCCIO, V. L., IJIMA, T., COLLINS, E. M., ROSENTHAL, G. G. et WARKENTIN, K. M. (2010). The shape of things to come : linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. *Journal of evolutionary biology*, 23(7):1364–73.
- GÓMEZ-SÁNCHEZ, E. P., ZHOU, M. et GOMEZ-SANCHEZ, C. E. (1996). Mineralocorticoids, salt and high blood pressure. *Steroids*, 61(4):184–8.
- GONZÁLEZ-SANCHO, J. M., GARCÍA, V., BONILLA, F. et MUÑOZ, A. (2003). Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer letters*, 192(2):121–32.
- GRAY, K. M. et JANSSENS, P. a. (1990). Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in *Xenopus laevis* tadpoles in vivo, but not in vitro. *General and comparative endocrinology*, 77(2):202–11.
- GREEN, S., WALTER, P., KUMAR, V., KRUST, A., BORNERT, J. M., ARGOS, P. et CHAMBON, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA : sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058):134–9.
- GREENSPAN, S. L. et GREENSPAN, F. S. (1999). The effect of thyroid hormone on skeletal integrity. *Annals of internal medicine*, 130(9):750–8.
- GRIMALDI, A., BUISINE, N., MILLER, T., SHI, Y.-B. et SACHS, L. M. (2012). Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development : Lessons from amphibian studies. *Biochimica et biophysica acta*.
- GRIMALDI, A. G., BUISINE, N., BILESIMO, P. et SACHS, L. M. (2013). *High-throughput sequencing will metamorphose the analysis of thyroid hormone receptor function during amphibian development.*, volume 103. Elsevier Inc., 1 édition.
- GROSS, F. et PITT-RIVERS, R. (1952). Experimental study of thyroid metabolism with radioactive iodine. *British medical bulletin*, 8(2-3):136–40.
- GROYER, A., SCHWEIZER-GROYER, G., CADEPOND, F., MARILLER, M. et BAULIEU, E. E. (1987). Antiglucocorticosteroid effects suggest why steroid hormone is required for receptors to bind DNA in vivo but not in vitro. *Nature*, 328(6131):624–6.
- GUDERNATSCH, J. F. (1912). Feeding Experiments on Tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 35(3):457–483.
- GUO, J. U., SU, Y., ZHONG, C., MING, G.-l. et SONG, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3):423–34.

- HALÁSZ, B. et PUPP, L. (1965). Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology*, 77(3):553–62.
- HALL, J. M., McDONNELL, D. P. et KORACH, K. S. (2002). Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 16(3):469–86.
- HAMMER, G. D., PARKER, K. L. et SCHIMMER, B. P. (2005). Minireview : transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology*, 146(3):1018–24.
- HAMY, F., HELBECQUE, N. et HENICHART, J. P. (1992). Comparison between synthetic nuclear localization signal peptides from the steroid/thyroid hormone receptors superfamily. *Biochemical and biophysical research communications*, 182(1):289–93.
- HARLAND, R. M. et GRAINGER, R. M. (2011). Xenopus research : metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in genetics : TIG*, 27(12):507–15.
- HARRIS, A. et SECKL, J. (2011). Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and behavior*, 59(3):279–89.
- HAVIS, E., SACHS, L. M. et DEMENEIX, B. a. (2003). Metamorphic T3-response genes have specific co-regulator requirements. *EMBO reports*, 4(9):883–8.
- HAYES, T., CHAN, R. et LICHT, P. (1993). Interactions of temperature and steroids on larval growth, development, and metamorphosis in a toad (*Bufo boreas*). *The Journal of experimental zoology*, 266(3):206–15.
- HAYES, T. B. et WU, T. H. (1994). Role of Corticosterone in Anuran Metamorphosis and Potential Role in Stress-Induced Metamorphosis. *Netherlands Journal of Zoology*, 45(1):107–109.
- HEIMEIER, R. A., HSIA, V. S. et SHI, Y.-B. (2008). Participation of Brahma-related gene 1 (BRG1)-associated factor 57 and BRG1-containing chromatin remodeling complexes in thyroid hormone-dependent gene activation during vertebrate development. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(5):1065–77.
- HELBING, C. C., WERRY, K., CRUMP, D., DOMANSKI, D., VELDHOEN, N. et BAILEY, C. M. (2003). Expression profiles of novel thyroid hormone-responsive genes and proteins in the tail of *Xenopus laevis* tadpoles undergoing precocious metamorphosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(7):1395–409.
- HELLSTEN, U., HARLAND, R. M., GILCHRIST, M. J., HENDRIX, D., JURKA, J., KAPITONOV, V., OVCHARENKO, I., PUTNAM, N. H., SHU, S., TAHER, L., BLITZ, I. L., BLUMBERG, B., DICHMANN, D. S., DUBCHAK, I., AMAYA, E., DETTER, J. C., FLETCHER, R., GERHARD, D. S., GOODSTEIN, D., GRAVES, T., GRIGORIEV, I. V., GRIMWOOD, J., KAWASHIMA, T., LINDQUIST, E., LUCAS, S. M., MEAD, P. E., MITROS, T., OGINO, H., OHTA, Y., POLIAKOV, A. V., POLLET, N., ROBERT, J., SALAMOV, A., SATER, A. K., SCHMUTZ, J., TERRY, A., VIZE, P. D., WARREN, W. C., WELLS, D., WILLS, A., WILSON, R. K., ZIMMERMAN, L. B., ZORN, A. M., GRAINGER, R., GRAMMER, T., KHOKHA, M. K., RICHARDSON, P. M. et ROKHSAR, D. S. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5978):633–6.
- HELLSTROM, I. C., DHIR, S. K., DIORIO, J. C. et MEANEY, M. J. (2012). Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone-serotonin-NGFI-A signalling cascade. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1601):2495–510.
- HENDRIX, D. A., HONG, J.-W., ZEITLINGER, J., ROKHSAR, D. S. et LEVINE, M. S. (2008). Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22):7762–7.
- HERMAN, J. P. et CULLINAN, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress : central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in neurosciences*, 20(2):78–84.
- HOLLENBERG, S. M., WEINBERGER, C., ONG, E. S., CERELLI, G., ORO, A., LEBO, R., THOMPSON, E. B., ROSENFELD, M. G. et EVANS, R. M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318(6047):635–41.
- HOLSTEIN, T. W. et LAUDET, V. (2014). Life-history evolution : at the origins of metamorphosis. *Current biology : CB*, 24(4):R159–61.
- HÖRLEIN, A. J., NÄÄR, A. M., HEINZEL, T., TORCHIA, J., GLOSS, B., KUROKAWA, R., RYAN, A., KAMEI, Y., SÖDERSTRÖM, M. et GLASS, C. K. (1995). Ligand-independent repression by the

- thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377(6548):397–404.
- HU, F., CRESPI, E. J. et DENVER, R. J. (2008). Programming neuroendocrine stress axis activity by exposure to glucocorticoids during postembryonic development of the frog, *Xenopus laevis*. *Endocrinology*, 149(11):5470–81.
- HUANG, Z.-Q., LI, J., SACHS, L. M., COLE, P. a. et WONG, J. (2003). A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *The EMBO journal*, 22(9):2146–55.
- IKEDA, M., RHEE, M. et CHIN, W. W. (1994). Thyroid hormone receptor monomer, homodimer, and heterodimer (with retinoid-X receptor) contact different nucleotide sequences in thyroid hormone response elements. *Endocrinology*, 135(4):1628–38.
- JOLIVET JAUDET, G. et LELOUP HATEY, J. (1984). Variations in aldosterone and corticosterone plasma levels during metamorphosis in *Xenopus laevis* tadpoles. *General and comparative endocrinology*, 56(1):59–65.
- JONES, I., NG, L., LIU, H. et FORREST, D. (2007). An intron control region differentially regulates expression of thyroid hormone receptor beta2 in the cochlea, pituitary, and cone photoreceptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(5):1108–19.
- JONES, I., SRINIVAS, M., NG, L. et FORREST, D. (2003). The thyroid hormone receptor beta gene : structure and functions in the brain and sensory systems. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 13(11):1057–68.
- JUNG, J.-C., WEST-MAYS, J. A., STRAMER, B. M., BYRNE, M. H., SCOTT, S., MODY, M. K., SADOW, P. M., KRANE, S. M. et FINI, M. E. (2004). Activity and expression of *Xenopus laevis* matrix metalloproteinases : identification of a novel role for the hormone prolactin in regulating collagenolysis in both amphibians and mammals. *Journal of cellular physiology*, 201(1):155–64.
- KARIN, M., HASLINGER, A., HOLTGREVE, H., RICHARDS, R. I., KRAUTER, P., WESTPHAL, H. M. et BEATO, M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature*, 308(5959):513–9.
- KEIJZER, R., BLOMMAART, P.-J. E., LABRUYÈRE, W. T., VERMEULEN, J. L. M., DOULABI, B. Z., BAKKER, O., TIBBOEL, D. et LAMERS, W. H. (2007). Expression of thyroid hormone receptors A and B in developing rat tissues ; evidence for extensive posttranscriptional regulation. *Journal of molecular endocrinology*, 38(5):523–35.
- KIKUYAMA, S., NIKI, K., MAYUMI, M. et KAWAMURA, K. (1982). Retardation of thyroxine-induced metamorphosis by Amphenone B in toad tadpoles. *Endocrinologia japonica*, 29(5):659–62.
- KIKUYAMA, S., NIKI, K., MAYUMI, M., SHIBAYAMA, R., NISHIKAWA, M. et SHINTAKE, N. (1983). Studies on corticoid action on the toad tadpole tail in vitro. *General and comparative endocrinology*, 52(3):395–9.
- KITANO, H. (2004). Biological robustness. *Nature reviews. Genetics*, 5(11):826–37.
- KLIEWER, S. A., UMESONO, K., MANGELSDORF, D. J. et EVANS, R. M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*, 355(6359):446–9.
- KLOAS, W., REINECKE, M. et HANKE, W. (1997). Stage-dependent changes in adrenal steroids and catecholamines during development in *Xenopus laevis*. *General and comparative endocrinology*, 108(3):416–26.
- KNOEDLER, J. R. et DENVER, R. J. (2014). Krüppel-like factors are effectors of nuclear receptor signaling. *General and comparative endocrinology*.
- KOBAYASHI, H. (1958). Effect of desoxycorticosterone acetate on metamorphosis induced by thyroxine in anuran tadpoles. *Endocrinology*, 62(4):371–377.
- KOLLER, K. J., WOLFF, R. S., WARDEN, M. K. et ZOELLER, R. T. (1987). Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20):7329–33.
- KRAIN, L. P. et DENVER, R. J. (2004). Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *The Journal of endocrinology*, 181(1):91–104.
- KRUDE, H., BIEBERMANN, H., KROHN, H. P., DRALLE, H. et GRÜTERS, A. (1997). Congenital hyperthyroidism. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 105 Suppl:6–11.

- KULKARNI, S. S. et BUCHHOLZ, D. R. (2012). Beyond synergy : corticosterone and thyroid hormone have numerous interaction effects on gene regulation in *Xenopus tropicalis* tadpoles. *Endocrinology*, 153(11):5309–24.
- KULKARNI, S. S., GOMEZ-MESTRE, I., MOSKALIK, C. L., STORZ, B. L. et BUCHHOLZ, D. R. (2011). Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *Journal of Evolutionary Biology*, 24:no–no.
- KUMAR, R. et THOMPSON, E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 64(5):310–9.
- KUMAR, R. et THOMPSON, E. B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor : structure :function relationship. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 94(5):383–94.
- KUMAR, R., VOLK, D. E., LI, J., LEE, J. C., GORENSTEIN, D. G. et THOMPSON, E. B. (2004). TATA box binding protein induces structure in the recombinant glucocorticoid receptor AF1 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47):16425–30.
- LANDAN, G., COHEN, N. M., MUKAMEL, Z., BAR, A., MOLCHADSKY, A., BROSH, R., HORN-SABAN, S., ZALCENSTEIN, D. A., GOLDFINGER, N., ZUNDELEVICH, A., GAL-YAM, E. N., ROTTER, V. et TANAY, A. (2012). Epigenetic polymorphism and the stochastic formation of differentially methylated regions in normal and cancerous tissues. *Nature genetics*, 44(11):1207–14.
- LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M. et SALZBERG, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3):R25.
- LANNAN, E. A., GALLIHER-BECKLEY, A. J., SCOLTOCK, A. B. et CIDLOWSKI, J. A. (2012). Proinflammatory actions of glucocorticoids : glucocorticoids and TNF α coregulate gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 153(8):3701–12.
- LARSEN, P. R. (1982). Thyroid-pituitary interaction : feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones. *The New England journal of medicine*, 306(1):23–32.
- LAUDET, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily : early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of molecular endocrinology*, 19(3):207–26.
- LAUDET, V. (2011). The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Current biology : CB*, 21(18):R726–37.
- LAURBERG, P. (1984). Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism : clinical and experimental*, 33(4):379–92.
- LAZAR, M. A. (2003). Thyroid hormone action : a binding contract. *The Journal of clinical investigation*, 112(4):497–9.
- LEFSTIN, J. a. et YAMAMOTO, K. R. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*, 392(6679):885–8.
- LELOUP, I., BUSCAGLIA, M. et de LUZE, A. (1981). [Modulation of T4 to T3 conversion. Comparative aspects (author's transl)]. *Annales d'endocrinologie*, 42(4-5):454–60.
- LELOUP, J. et BUSCAGLIA, M. (1977). Triiodothyronine, hormone of amphibian metamorphosis. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D*, 284:2261–2263.
- LEONARD, J. et FARWELL, A. (2006). Cytoskeletal actions of iodothyronines. In *Proceedings of the 88th Annual Meeting of The Endocrine Society*, Boston, MA.
- LIGGINS, G. C. (1994). The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reproduction, fertility, and development*, 6(2):141–50.
- LIN, K. H., PARKISON, C., MCPHIE, P. et CHENG, S. Y. (1991). An essential role of domain D in the hormone-binding activity of human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(4):485–92.
- LISSITZKY, S. (1981). Biosynthesis and secretion of thyroglobulin. *Annales d'endocrinologie*, 42(4-5):363–73.
- LIU, D., DIORIO, J., TANNENBAUM, B., CALDJI, C., FRANCIS, D., FREEDMAN, A., SHARMA, S., PEARSON, D., PLOTSKY, P. M. et MEANEY, M. J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, 277(5332):1659–1662.

- LIU, X., GAO, Q., LI, P., ZHAO, Q., ZHANG, J., LI, J., KOSEKI, H. et WONG, J. (2013). UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nature communications*, 4:1563.
- LOMBARDI, A., LANNI, A., MORENO, M., BRAND, M. D. et GOGLIA, F. (1998). Effect of 3,5-di-iodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus. *The Biochemical journal*, 330 (Pt 1:521–6.
- LÖWENBERG, M., VERHAAR, A. P., BILDERBEEK, J., van MARLE, J., BUTTGEREIT, F., PEPPELENBOSCH, M. P., van DEVENTER, S. J. et HOMMES, D. W. (2006). Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO reports*, 7(10):1023–9.
- LU, N. Z. et CIDLOWSKI, J. a. (2004). The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024:102–23.
- LU, N. Z. et CIDLOWSKI, J. a. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Molecular cell*, 18(3):331–42.
- LU, N. Z. et CIDLOWSKI, J. a. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in cell biology*, 16(6):301–7.
- LUECKE, H. F. et YAMAMOTO, K. R. (2005). The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes & development*, 19(9):1116–27.
- LUISI, B. F., XU, W. X., OTWINOWSKI, Z., FREEDMAN, L. P., YAMAMOTO, K. R. et SIGLER, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, 352(6335):497–505.
- MACHUCA, I., ESSLEMONT, G., FAIRCLOUGH, L. et TATA, J. R. (1995). Analysis of structure and expression of the Xenopus thyroid hormone receptor-beta gene to explain its autoinduction. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 9(1):96–107.
- MAGNUS-LEVY, A. (1895). Über den respiratorischen gaswechsel unter dem einfluss der thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen zuständen. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 32:650–652.
- MAIA, A. L., GOEMANN, I. M., MEYER, E. L. S. et WAJNER, S. M. (2011). Deiodinases : the balance of thyroid hormone : type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *The Journal of endocrinology*, 209(3):283–97.
- MAJUMDAR, A. P. et NIELSEN, H. (1985). Influence of glucocorticoids on prenatal development of the gut and pancreas in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 20(1):65–71.
- MANGELSDORF, D. J., ONG, E. S., DYCK, J. A. et EVANS, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, 345(6272):224–9.
- MARCHETTI, M. C., DI MARCO, B., CIFONE, G., MIGLIORATI, G. et RICCARDI, C. (2003). Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes : role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood*, 101(2):585–93.
- MATHELIER, A., ZHAO, X., ZHANG, A. W., PARCY, F., WORSLEY-HUNT, R., ARENILLAS, D. J., BUCHMAN, S., CHEN, C.-y., CHOU, A., IENASESCU, H., LIM, J., SHYR, C., TAN, G., ZHOU, M., LENHARD, B., SANDELIN, A. et WASSERMAN, W. W. (2014). JASPAR 2014 : an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*, 42(Database issue):D142–7.
- MATI, J. K., HORROBIN, D. F. et BRAMLEY, P. S. (1973). Induction of labour in sheep and in humans by single doses of corticosteroids. *British medical journal*, 2(5859):149–51.
- MATSUSHITA, A., SASAKI, S., KASHIWABARA, Y., NAGAYAMA, K., OHBA, K., IWAKI, H., MISAWA, H., ISHIZUKA, K. et NAKAMURA, H. (2007). Essential role of GATA2 in the negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone and its receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(4):865–84.
- MCGOWAN, P. O., SASAKI, A., D’ALESSIO, A. C., DYMOV, S., LABONTÉ, B., SZYF, M., TURECKI, G. et MEANEY, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*, 12(3):342–8.
- McKAY, L. I. et CIDLOWSKI, J. A. (2003a). Hormones of the Adrenal Cortex. In *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*. BC Decker, 6th editio édition.
- McKAY, L. I. et CIDLOWSKI, J. A. (2003b). Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. In Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C.,

- GANSLER, T. S., HOLLAND, J. F. et FREI, E., éditeurs : *Holland-Frei Cancer Medicine*. BC Decker, 6th editio édition.
- MCMAHON, M., GERICH, J. et RIZZA, R. (1988). Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes/metabolism reviews*, 4(1):17–30.
- MEIJSSING, S. H., PUFALL, M. A., SO, A. Y., BATES, D. L., CHEN, L. et YAMAMOTO, K. R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5925):407–10.
- MEISSNER, A., MIKKELSEN, T. S., GU, H., WERNIG, M., HANNA, J., SIVACHENKO, A., ZHANG, X., BERNSTEIN, B. E., NUSBAUM, C., JAFFE, D. B., GNIRKE, A., JAENISCH, R. et LANDER, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205):766–70.
- MENDOZA, A., NAVARRETE-RAMÍREZ, P., HERNÁNDEZ-PUGA, G., VILLALOBOS, P., HOLZER, G., RENAUD, J. P., LAUDET, V. et OROZCO, A. (2013). 3,5-T2 is an alternative ligand for the thyroid hormone receptor $\beta 1$. *Endocrinology*, 154(8):2948–58.
- MIDDLEMIS MAHER, J., WERNER, E. E. et DENVER, R. J. (2013). Stress hormones mediate predator-induced phenotypic plasticity in amphibian tadpoles. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280(1758):20123075.
- MILLER, L. D., MCPHIE, P., SUZUKI, H., KATO, Y., LIU, E. T. et CHENG, S.-y. (2004). Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance. *Genome biology*, 5(5):R31.
- MIYAMOTO, T., KAKIZAWA, T., ICHIKAWA, K., NISHIO, S., TAKEDA, T., SUZUKI, S., KANEKO, a., KUMAGAI, M., MORI, J., YAMASHITA, K., SAKUMA, T. et HASHIZUME, K. (2001). The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 181(1-2):229–38.
- MONK, M., BOUBELIK, M. et LEHNERT, S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development (Cambridge, England)*, 99(3):371–82.
- MONTESINOS, M. M., ALAMINO, V. a., MASCANFRONI, I. D., SUSPERREGUY, S., GIGENA, N., MASINI-REPISO, A. M., RABINOVICH, G. a. et PELLIZAS, C. G. (2012). Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids*, 77(1-2):67–76.
- MONTESINOS, M. M., PELLIZAS, C. G., VÉLEZ, M. L., SUSPERREGUY, S., MASINI-REPISO, A. M. et COLEONI, A. H. (2006). Thyroid hormone receptor beta1 gene expression is increased by Dexamethasone at transcriptional level in rat liver. *Life sciences*, 78(22):2584–94.
- MORVAN DUBOIS, G., SEBILLOT, A., KUIPER, G. G. J. M., VERHOELST, C. H. J., DARRAS, V. M., VISSER, T. J. et DEMENEIX, B. a. (2006). Deiodinase activity is present in *Xenopus laevis* during early embryogenesis. *Endocrinology*, 147(10):4941–9.
- MOZO, L., SUÁREZ, A. et GUTIÉRREZ, C. (2004). Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(3):406–12.
- MUKAIDA, N., MORITA, M., ISHIKAWA, Y., RICE, N., OKAMOTO, S., KASAHARA, T. et MATSUSHIMA, K. (1994). Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *The Journal of biological chemistry*, 269(18):13289–95.
- MUNCK, A. U. et NÁRAY-FEJES-TÓTH, A. (2010). Glucocorticoid action : Physiology. In JAMESON, J. L., GROOT, L. J. D., de KRETZER, D., GROSSMAN, A., MARSHALL, J. C., MELMED, S., POTTS, J. T. et WEIR, G. C., éditeurs : *Endocrinology : Adult and Pediatric*, chapitre Chapter 97. Elsevier, 6th editio édition.
- MUNHOZ, C. D., SORRELLS, S. F., CASO, J. R., SCAVONE, C. et SAPOLSKY, R. M. (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(41):13690–8.
- NATIONAL GUIDELINE CLEARINGHOUSE (2010). Antenatal corticosteroids to reduce neonatal morbidity and mortality.
- NELSON, C. C., FARIS, J. S., HENDY, S. C. et ROMANIUK, P. J. (1993). Functional analysis of the amino acids in the DNA recognition alpha-helix of the human thyroid hormone receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(9):1185–95.

- NESAN, D. et VIJAYAN, M. M. (2013). The transcriptomics of glucocorticoid receptor signaling in developing zebrafish. *PloS one*, 8(11):e80726.
- NEWTON, R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action : what is important ? *Thorax*, 55(7):603–613.
- NIAZI, A. K., KALRA, S., IRFAN, A. et ISLAM, A. (2011). Thyroidology over the ages. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 15(Suppl 2):S121–6.
- NIEUWKOOP, P. et FABER, J. (1956). *Normal table of Xenopus Laevis (Daudin) : a systematic and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis*. Amsterdam : North-Holland Pub. Co, 1 édition.
- NISSEN, R. M. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappa B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & Development*, 14(18):2314–2329.
- NORDEEN, S. K., SUH, B. J., KÜHNEL, B. et HUTCHISON, C. A. (1990). Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 4(12):1866–73.
- NUSSEY, S. et WHITEHEAD, S. (2001). The adrenal gland. In *Endocrinology : An Integrated Approach*, chapitre Chapter 4. Oxford : BIOS Scientific Publishers.
- NYBORG, J. K., NGUYEN, a. P. et SPINDLER, S. R. (1984). Relationship between thyroid and glucocorticoid hormone receptor occupancy, growth hormone gene transcription, and mRNA accumulation. *The Journal of biological chemistry*, 259(20):12377–81.
- OAKLEY, R. H., JEWELL, C. M., YUDT, M. R., BOFETIADO, D. M. et CIDLOWSKI, J. A. (1999). The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *The Journal of biological chemistry*, 274(39):27857–66.
- OJAMAA, K. (2010). Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Vascular pharmacology*, 52(3-4):113–9.
- ONISHI, R. M. et GAFFEN, S. L. (2010). Interleukin-17 and its target genes : mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129(3):311–21.
- ORCHINIK, M., MURRAY, T. F. et MOORE, F. L. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5014):1848–51.
- OSEI-KUMAH, A., SMITH, R., JURISICA, I., CANIGGIA, I. et CLIFTON, V. L. (2011). Sex-specific differences in placental global gene expression in pregnancies complicated by asthma. *Placenta*, 32(8):570–8.
- PALHA, J. A. (2002). Transthyretin as a thyroid hormone carrier : function revisited. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 40(12):1292–1300.
- PARIS, M., BRUNET, F., MARKOV, G. V., SCHUBERT, M. et LAUDET, V. (2008). The amphioxus genome enlightens the evolution of the thyroid hormone signaling pathway. *Development genes and evolution*, 218(11-12):667–80.
- PARKER, T. L., KESSE, W. K., MOHAMED, A. A. et AFEWORK, M. (1993). The innervation of the mammalian adrenal gland. *Journal of anatomy*, 183 (Pt 2):265–76.
- PARRILLO, J. E. et FAUCI, A. S. (1979). Mechanisms of glucocorticoid action on immune processes. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 19(2):179–201.
- PATTERSON, S. H., HAHN, T. P., CORNELIUS, J. M. et BREUNER, C. W. (2014). Natural selection and glucocorticoid physiology. *Journal of evolutionary biology*, 27(2):259–74.
- PAYVAR, F., WRANGE, O., CARLSTEDT-DUKE, J., OKRET, S., GUSTAFSSON, J. a. et YAMAMOTO, K. R. (1981). Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11):6628–32.
- PEARCE, D. et YAMAMOTO, K. R. (1993). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5098):1161–5.
- PHILIP, J. G., FLOWER, R. J. et BUCKINGHAM, J. C. (1997). Glucocorticoids modulate the cellular disposition of lipocortin 1 in the rat brain in vivo and in vitro. *Neuroreport*, 8(8):1871–6.
- PHILLIPS, D. M., LAKSHMI, V. et MONDER, C. (1989). Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology*, 125(1):209–16.
- PIERCE, R. A., MARIENCHECK, W. I., SANDEFUR, S., CROUCH, E. C. et PARKS, W. C. (1995). Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *The American journal of physiology*, 268(3 Pt 1):L491–500.

- PLAGEMANN, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Hormone research*, 65 Suppl 3:83–9.
- PLATEROTI, M., GAUTHIER, K., DOMON-DELL, C., FREUND, J. N., SAMARUT, J. et CHASSANDE, O. (2001). Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Molecular and cellular biology*, 21(14):4761–72.
- PRATT, W. B., MORISHIMA, Y., MURPHY, M. et HARRELL, M. (2006). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handbook of experimental pharmacology*, 172:111–38.
- PSARRA, A.-M. G. et SEKERIS, C. E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB life*, 60(4):210–23.
- RAMADOSS, P., ABRAHAM, B. J., TSAI, L., ZHOU, Y., Costa-e SOUSA, R. H., YE, F., BILBAN, M., ZHAO, K. et HOLLENBERG, A. N. (2014). Novel mechanism of positive versus negative regulation by thyroid hormone receptor $\beta 1$ (TR $\beta 1$) identified by genome-wide profiling of binding sites in mouse liver. *The Journal of biological chemistry*, 289(3):1313–28.
- RANA, B., MISCHOULON, D., XIE, Y., BUCHER, N. L. et FARMER, S. R. (1994). Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes : reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Molecular and cellular biology*, 14(9):5858–69.
- RANJAN, M., WONG, J. et SHI, Y.-b. (1994). Transcriptional repression of Xenopus TR beta gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site. *The Journal of biological chemistry*, 269(40):24699–705.
- RAO, G., ECKEL, J., RAO, M. et BREUER, H. (1976). Uptake of thyroid hormone by isolated rat liver cells. *Biochemical and biophysical ...*, 73(1):98–104.
- RAY, a. et PREFONTAINE, K. E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2):752–6.
- REDDY, A. B., MAYWOOD, E. S., KARP, N. A., KING, V. M., INOUE, Y., GONZALEZ, F. J., LILLEY, K. S., KYRIACOU, C. P. et HASTINGS, M. H. (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(6):1478–88.
- REILLY, M. M., PANTOJA, C., HU, X., CHINENOV, Y. et ROGATSKY, I. (2006). The GRIP1 :IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *The EMBO journal*, 25(1):108–17.
- REUL, J. M., de KLOET, E. R., van SLUIJS, F. J., RIJNBERK, A. et ROTHUIZEN, J. (1990). Binding characteristics of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in dog brain and pituitary. *Endocrinology*, 127(2):907–15.
- RICHARD, D., CHAPDELAINE, S., DESHAIES, Y., PÉPIN, M. C. et BARDEN, N. (1993). Energy balance and lipid metabolism in transgenic mice bearing an antisense GCR gene construct. *The American journal of physiology*, 265(1 Pt 2):R146–50.
- ROBINSON-RECHAVI, M., CARPENTIER, A. S., DUFFRAISSE, M. et LAUDET, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends in genetics : TIG*, 17(10):554–6.
- ROBINSON-RECHAVI, M., ESCRIVA GARCIA, H. et LAUDET, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of cell science*, 116(Pt 4):585–6.
- ROBSON, H., SIEBLER, T., SHALET, S. M. et WILLIAMS, G. R. (2002). Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatric research*, 52(2):137–47.
- ROCHE, J. (1952). Biochemistry of the thyroid gland and of the thyroid hormone. *Strasbourg médical*, 3(4):240–7.
- ROG-ZIELINSKA, E. A., THOMSON, A., KENYON, C. J., BROWNSTEIN, D. G., MORAN, C. M., SZUMSKA, D., MICHAILIDOU, Z., RICHARDSON, J., OWEN, E., WATT, A., MORRISON, H., FORRESTER, L. M., BHATTACHARYA, S., HOLMES, M. C. et CHAPMAN, K. E. (2013). Glucocorticoid receptor is required for foetal heart maturation. *Human molecular genetics*, 22(16):3269–82.
- ROGATSKY, I., LUECKE, H. F., LEITMAN, D. C. et YAMAMOTO, K. R. (2002). Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26):16701–6.

- ROLLINS-SMITH, L. a., BARKER, K. S. et DAVIS, a. T. (1997). Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. *Developmental immunology*, 5(2):145–52.
- ROSNER, W. (1990). The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin : recent advances. *Endocrine reviews*, 11(1):80–91.
- ROUSSEAU, G., BAXTER, J. et TOMKINS, G. (1972). Glucocorticoid Receptors : Relations between Steroid Binding and Biological Effects. *Journal of molecular biology*, pages 99–115.
- ROUSSET, B. (2003). The iodine pathways within the thyroid gland : physiological aspects. *Annales d'endocrinologie*, 64(1):4–7.
- SACHS, L. M., DAMJANOVSKI, S., JONES, P. L., LI, Q., AMANO, T., UEDA, S., SHI, Y.-b. et ISHIZUYA-OKA, A. (2000). Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 126(2):199–211.
- SAFRAN, M., FARWELL, A., ROKOS, H. et LEONARD, J. L. (1993). Structural requirements of iodothyronines for the rapid inactivation and internalization of type II iodothyronine 5'-deiodinase in glial cells. *The Journal of biological chemistry*, 268(19):14224–9.
- SAKAI, D. D., HELMS, S., CARLSTEDT-DUKE, J., GUSTAFSSON, J. a., ROTTMAN, F. M. et YAMAMOTO, K. R. (1988). Hormone-mediated repression : a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes & development*, 2(9):1144–54.
- SAMUELS, H. H. et TSAI, J. S. (1973). Thyroid Hormone Action in Cell Culture : Demonstration of Nuclear Receptors in Intact Cells and Isolated Nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12):3488–3492.
- SAP, J., MUÑOZ, A., DAMM, K., GOLDBERG, Y., GHYSDAEL, J., LEUTZ, A., BEUG, H. et VENNSTRÖM, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 324(6098):635–40.
- SAPOLSKY, R. M., ROMERO, L. M. et MUNCK, a. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*, 21(1):55–89.
- SASAKI, S., LESOON-WOOD, L. a., DEY, a., KUWATA, T., WEINTRAUB, B. D., HUMPHREY, G., YANG, W. M., SETO, E., YEN, P. M., HOWARD, B. H. et OZATO, K. (1999). Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *The EMBO journal*, 18(19):5389–98.
- SAVORY, J. G., PRÉFONTAINE, G. G., LAMPRECHT, C., LIAO, M., WALTHER, R. F., LEFEBVRE, Y. A. et HACHÉ, R. J. (2001). Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Molecular and cellular biology*, 21(3):781–93.
- SCANLAN, T. S., SUCHLAND, K. L., HART, M. E., CHIELLINI, G., HUANG, Y., KRIZICH, P. J., FRASCARELLI, S., CROSSLEY, D. A., BUNZOW, J. R., RONCA-TESTONI, S., LIN, E. T., HATTON, D., ZUCCHI, R. et GRANDY, D. K. (2004). 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nature medicine*, 10(6):638–42.
- SCHAEFFER, C., DIAB-ASSEF, M., PLATEROTI, M., LAURENT-HUCK, F., REIMUND, J. M., KEDINGER, M. et FOLTZER-JOURDAINNE, C. (2000). Cytokine gene expression during postnatal small intestinal development : regulation by glucocorticoids. *Gut*, 47(2):192–8.
- SCHAEFFER, S. W. et SULEIMAN, M. S., éditeurs (2007). *Mitochondria : The Dynamic Organelle*. Springer.
- SCHNEIDER, M. J., FIERING, S. N., THAI, B., WU, S.-y., ST GERMAIN, E., PARLOW, A. F., ST GERMAIN, D. L. et GALTON, V. A. (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology*, 147(1):580–9.
- SCHRÄDER, M., BECKER-ANDRÉ, M. et CARLBERG, C. (1994). Thyroid hormone receptor functions as monomeric ligand-induced transcription factor on octameric half-sites. Consequences also for dimerization. *The Journal of biological chemistry*, 269(9):6444–9.
- SCHREIBER, A. M. (2011). Visualizing and quantifying the suppressive effects of glucocorticoids on the tadpole immune system in vivo. *Advances in physiology education*, 35(4):445–53.
- SCHREIBER, A. M. et BROWN, D. D. (2003). Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4):1769–74.

- SCHREIBER, a. M., DAS, B., HUANG, H., MARSH-ARMSTRONG, N. et BROWN, D. D. (2001). Diverse developmental programs of *Xenopus laevis* metamorphosis are inhibited by a dominant negative thyroid hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19):10739–44.
- SCHUSSLER, G. C. (2000). The thyroxine-binding proteins. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 10(2):141–149.
- SCHWARTZ, H. L., LAZAR, M. A. et OPPENHEIMER, J. H. (1994). Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta 2 receptor (TR beta 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. *The Journal of biological chemistry*, 269(40):24777–82.
- SCOBIE, K. N., HALL, B. J., WILKE, S. A., KLEMENHAGEN, K. C., FUJII-KURIYAMA, Y., GHOSH, A., HEN, R. et SAHAY, A. (2009). Krüppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(31):9875–87.
- SECKL, J. R. et WALKER, B. R. (2001). Minireview : 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 142(4):1371–6.
- SELYE, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 6(2):117–230.
- SHI, Y.-b. (1998). *Amphibian Metamorphosis : From Morphology to Molecular Biology*. Wiley-Liss, 1st editio édition.
- SHI, Y.-b., FU, L., HSIA, S. C., TOMITA, a. et BUCHHOLZ, D. (2001). Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling during anuran metamorphosis. *Cell research*, 11(4):245–52.
- SHI, Y. B., LIANG, V. C., PARKISON, C. et CHENG, S. Y. (1994). Tissue-dependent developmental expression of a cytosolic thyroid hormone protein gene in *Xenopus* : its role in the regulation of amphibian metamorphosis. *FEBS letters*, 355(1):61–4.
- SIEGRIST-KAISER, C. A., JUGE-AUBRY, C., TRANTER, M. P., EKENBARGER, D. M. et LEONARD, J. L. (1990). Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *The Journal of biological chemistry*, 265(9):5296–302.
- SIMPSON, S. A., TAIT, J. F. et BUSH, I. E. (1952). Secretion of a salt-retaining hormone by the mammalian adrenal cortex. *Lancet*, 2(6727):226–8.
- SIMPSON, S. A., TAIT, J. F., WETTSTEIN, A., NEHER, R., VON EUW, J., SCHINDLER, O. et REICHSTEIN, T. (1954). [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid]. *Experientia*, 10(3):132–3.
- SINZELLE, L., THURET, R., HWANG, H.-Y., HERSZBERG, B., PAILLARD, E., BRONCHAIN, O. J., STEMPLE, D. L., DHORNE-POLLET, S. et POLLET, N. (2012). Characterization of a novel *Xenopus tropicalis* cell line as a model for in vitro studies. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 50(3):316–24.
- SLATER, E. P., RABENAU, O., KARIN, M., BAXTER, J. D. et BEATO, M. (1985). Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Molecular and cellular biology*, 5(11):2984–92.
- SRIRAMARAO, P., MENDLER, M. et BOURDON, M. A. (1993). Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *Journal of cell science*, 105 (Pt 4):1001–12.
- STAHN, C. et BUTTGEREIT, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature clinical practice. Rheumatology*, 4(10):525–33.
- STÖCKLIN, E., WISSLER, M., GOUILLEUX, F. et GRONER, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, 383(6602):726–8.
- STOECKLIN, E., WISSLER, M., MORIGGL, R. et GRONER, B. (1997). Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Molecular and cellular biology*, 17(11):6708–16.
- STRAIT, K. a., SCHWARTZ, H. L., SEYBOLD, V. S., LING, N. C. et OPPENHEIMER, J. H. (1991). Immunofluorescence localization of thyroid hormone receptor protein beta 1 and variant alpha 2 in selected tissues : cerebellar Purkinje cells as a model for beta 1 receptor-mediated developmental effects of thyroid hormone in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9):3887–91.
- SUPEK, F., BOŠNJAK, M., ŠKUNCA, N. et ŠMUC, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one*, 6(7):e21800.

- SURJIT, M., GANTI, K. P., MUKHERJI, A., YE, T., HUA, G., METZGER, D., LI, M. et CHAMBON, P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*, 145(2):224–41.
- TAGAMI, T., YAMAMOTO, H., MORIYAMA, K., SAWAI, K., USUI, T., SHIMATSU, A. et NARUSE, M. (2010). Identification of a novel human thyroid hormone receptor beta isoform as a transcriptional modulator. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(4):983–8.
- TAMURA, M., MATSUURA, B., MIYAUCHI, S. et ONJI, M. (1999). Dendritic cells produce interleukin-12 in hyperthyroid mice. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 141(6):625–9.
- TATA, J. R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and cellular endocrinology*, 246(1-2):10–20.
- TATA, J. R., KAWAHARA, a. et BAKER, B. S. (1991). Prolactin inhibits both thyroid hormone-induced morphogenesis and cell death in cultured amphibian larval tissues. *Developmental biology*, 146(1):72–80.
- THOMPSON, C. C. (1996). Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(24):7832–40.
- THOMPSON, C. C., WEINBERGER, C., LEBOWITZ, R. et EVANS, R. M. (1987). Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4822):1610–4.
- THORNTON, J. W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10):5671–6.
- TONE, Y., COLLINGWOOD, T. N., ADAMS, M. et CHATTERJEE, V. K. (1994). Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. *The Journal of biological chemistry*, 269(49):31157–61.
- TRAPP, T., RUPPRECHT, R., CASTRÉN, M., REUL, J. M. et HOLDSBOER, F. (1994). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor : a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*, 13(6):1457–62.
- TSIGOS, C. et CHROUSOS, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*, 53(4):865–71.
- TUMLIN, J. A., LEA, J. P., SWANSON, C. E., SMITH, C. L., EDGE, S. S. et SOMEREN, J. S. (1997). Aldosterone and dexamethasone stimulate calcineurin activity through a transcription-independent mechanism involving steroid receptor-associated heat shock proteins. *The Journal of clinical investigation*, 99(6):1217–23.
- UHLENHAUT, N. H., BARISH, G. D., YU, R. T., DOWNES, M., KARUNASIRI, M., LIDDLE, C., SCHWALIE, P., HÜBNER, N. et EVANS, R. M. (2013). Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes. *Molecular cell*, 49(1):158–71.
- UMESONO, K., GIGUÈRE, V., GLASS, C. K., ROSENFELD, M. G. et EVANS, R. M. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature*, 336(6196):262–5.
- URNOV, F. D. et WOLFFE, a. P. (2001). An array of positioned nucleosomes potentiates thyroid hormone receptor action in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 276(23):19753–61.
- VAGENAKIS, A. G., DOWNS, P., BRAVERMAN, L. E., BURGER, A. et INGBAR, S. H. (1973). Control of thyroid hormone secretion in normal subjects receiving iodides. *The Journal of clinical investigation*, 52(2):528–32.
- van der HEIDE, S. M., JOOSTEN, B. J. L. J., DRAGT, B. S., EVERTS, M. E. et KLAREN, P. H. M. (2007). A physiological role for glucuronidated thyroid hormones : preferential uptake by H9c2(2-1) myotubes. *Molecular and cellular endocrinology*, 264(1-2):109–17.
- VENTURA-CLAPIER, R., GARNIER, A. et VEKSLER, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis : the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular research*, 79(2):208–17.
- VENTURA-HOLMAN, T., MAMOON, A., MAHER, J. F. et SUBAUSTE, J. S. (2007). Thyroid hormone responsive genes in the murine hepatocyte cell line AML 12. *Gene*, 396(2):332–7.
- VISSER, T. J. (1994). Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chemico-biological interactions*, 92(1-3):293–303.

- VISSER, T. J., KAPTEIN, E., GIJZEL, A., de HERDER, W. W., CANNON, M. L., BONTHUIS, F. et de GREEF, W. J. (1996). Effects of thyroid status and thyrostatic drugs on hepatic glucuronidation of lodothyronines and other substrates in rats : Induction of phenol UDP-glucuronyltransferase by methimazole. *Endocrine*, 4(1):79–85.
- VISSER, T. J., van BUUREN, J. C., RUTGERS, M., EELKMAN ROODA, S. J. et de HERDER, W. W. (1990). The role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism : TEM*, 1(4):211–8.
- WADA, H. (2008). Glucocorticoids : mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and comparative endocrinology*, 156(3):441–53.
- WAGNER, M. S., WAJNER, S. M. et MAIA, A. L. (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *The Journal of endocrinology*, 199(3):351–65.
- WAGNER, R. L., APRILETTI, J. W., MCGRATH, M. E., WEST, B. L., BAXTER, J. D. et FLETTERICK, R. J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 378(6558):690–7.
- WAHLSTRÖM, G. M., SJÖBERG, M., ANDERSSON, M., NORDSTRÖM, K. et VENNSTRÖM, B. (1992). Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(7):1013–22.
- WANG, H., IAKOVA, P., WILDE, M., WELM, A., GOODE, T., ROESLER, W. J. et TIMCHENKO, N. A. (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Molecular cell*, 8(4):817–28.
- WANG, X., CARRÉ, W., SAXTON, A. M. et COGBURN, L. A. (2007). Manipulation of thyroid status and/or GH injection alters hepatic gene expression in the juvenile chicken. *Cytogenetic and genome research*, 117(1-4):174–88.
- WANG, Z. et BROWN, D. D. (1993). Thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption. *The Journal of biological chemistry*, 268(22):16270–8.
- WATSON, L. C., KUCHENBECKER, K. M., SCHILLER, B. J., GROSS, J. D., PUFALL, M. A. et YAMAMOTO, K. R. (2013). The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals. *Nature structural & molecular biology*, 20(7):876–83.
- WEAVER, I. C. G., CERVONI, N., CHAMPAGNE, F. A., D’ALESSIO, A. C., SHARMA, S., SECKL, J. R., DYMOV, S., SZYF, M. et MEANEY, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7(8):847–54.
- WEINBERGER, C., HOLLENBERG, S. M., ONG, E. S., HARMON, J. M., BROWER, S. T., CIDLOWSKI, J., THOMPSON, E. B., ROSENFELD, M. G. et EVANS, R. M. (1985). Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4700):740–2.
- WEINBERGER, C., THOMPSON, C. C., ONG, E. S., LEBO, R., GRUOL, D. J. et EVANS, R. M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324(6098):641–6.
- WEISSMAN, C. (1990). The metabolic response to stress : an overview and update. *Anesthesiology*, 73(2):308–27.
- WEITZEL, J. M. (2008). To bind or not to bind - how to down-regulate target genes by liganded thyroid hormone receptor? *Thyroid research*, 1(1):4.
- WEITZEL, J. M., HAMANN, S., JAUK, M., LACEY, M., FILBRY, A., RADTKE, C., IWEN, K. A. H., KUTZ, S., HARNEIT, A., LIZARDI, P. M. et SEITZ, H. J. (2003). Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *Journal of molecular endocrinology*, 31(2):291–303.
- WHITTLE, W. L., PATEL, F. A., ALFAIDY, N., HOLLOWAY, A. C., FRASER, M., GYOMOREY, S., LYE, S. J., GIBB, W. et CHALLIS, J. R. (2001). Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition : the relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. *Biology of reproduction*, 64(4):1019–32.
- WIGHT, P. a., CREW, M. D. et SPINDLER, S. R. (1987). Discrete positive and negative thyroid hormone-responsive transcription regulatory elements of the rat growth hormone gene. *The Journal of biological chemistry*, 262(12):5659–63.
- WILLIAMS, G. R. (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Molecular and cellular biology*, 20(22):8329–42.
- WILLIAMS, G. R. et BASSETT, J. H. D. (2011). Deiodinases : the balance of thyroid hormone : local control of thyroid hormone action : role of type 2 deiodinase. *The Journal of endocrinology*, 209(3):261–72.

- WOJCICKA, A., BASSETT, J. H. D. et WILLIAMS, G. R. (2013). Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(7):3979–86.
- WOLFFE, A. P., WONG, J., LI, Q., LEVI, B. Z. et SHI, Y.-b. (1997). Three steps in the regulation of transcription by the thyroid hormone receptor : establishment of a repressive chromatin structure, disruption of chromatin and transcriptional activation. *Biochemical Society transactions*, 25(2):612–5.
- WONG, J., LIANG, V. C., SACHS, L. M. et SHI, Y.-b. (1998a). Transcription from the thyroid hormone-dependent promoter of the *Xenopus laevis* thyroid hormone receptor betaA gene requires a novel upstream element and the initiator, but not a TATA Box. *The Journal of biological chemistry*, 273(23):14186–93.
- WONG, J., PATTERTON, D., IMHOF, a., GUSCHIN, D., SHI, Y.-b. et WOLFFE, a. P. (1998b). Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *The EMBO journal*, 17(2):520–34.
- WONG, J., SHI, Y.-b. et WOLFFE, a. P. (1995). A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR beta A gene by the thyroid hormone receptor. *Genes & Development*, 9(21):2696–2711.
- WONG, J., SHI, Y.-b. et WOLFFE, a. P. (1997). Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor : hormone-regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation. *The EMBO journal*, 16(11):3158–71.
- WRANGE, O., ERIKSSON, P. et PERLMANN, T. (1989). The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *The Journal of biological chemistry*, 264(9):5253–9.
- WRUTNIAK, C., CASSAR-MALEK, I., MARCHAL, S., RASCLE, A., HEUSSER, S., KELLER, J. M., FLÉCHON, J., DAUÇA, M., SAMARUT, J. et GHYSDAEL, J. (1995). A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *The Journal of biological chemistry*, 270(27):16347–54.
- WRUTNIAK-CABELLO, C., CASAS, F. et CABELLO, G. (2001). Thyroid hormone action in mitochondria. *Journal of molecular endocrinology*, 26(1):67–77.
- WU, S. C. et ZHANG, Y. (2010). Active DNA demethylation : many roads lead to Rome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9):607–20.
- WU, S. Y., KLEIN, A. H., CHOPRA, I. J. et FISHER, D. A. (1978). Alterations in tissue thyroxine-5'-monodeiodinating activity in perinatal period. *Endocrinology*, 103(1):235–9.
- WULF, A., WETZEL, M. G., KEBENKO, M., KRÖGER, M., HARNEIT, A., MERZ, J. et WEITZEL, J. M. (2008). The role of thyroid hormone receptor DNA binding in negative thyroid hormone-mediated gene transcription. *Journal of molecular endocrinology*, 41(1):25–34.
- XIE, H., WANG, M., de ANDRADE, A., BONALDO, M. d. F., GALAT, V., ARNDT, K., RAJARAM, V., GOLDMAN, S., TOMITA, T. et SOARES, M. B. (2011). Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic acids research*, 39(10):4099–108.
- YAOITA, Y. et BROWN, D. D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes & Development*, 4(11):1917–1924.
- YUDT, M. R., JEWELL, C. M., BIENSTOCK, R. J. et CIDLOWSKI, J. A. (2003). Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Molecular and cellular biology*, 23(12):4319–30.
- ZHANG, T. Y., LABONTÉ, B., WEN, X. L., TURECKI, G. et MEANEY, M. J. (2013). Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(1):111–23.
- ZHANG, X. K., HOFFMANN, B., TRAN, P. B., GRAUPNER, G. et PFAHL, M. (1992). Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature*, 355(6359):441–6.
- ZIMMERMANN, M. B. (2009). Iodine deficiency. *Endocrine reviews*, 30(4):376–408.
- ZOU, X., MA, W., SOLOV'YOV, I. A., CHIPOT, C. et SCHULTEN, K. (2012). Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins. *Nucleic acids research*, 40(6):2747–58.

Résumé

La métamorphose des amphibiens est le processus rapide et irréversible par lequel un têtard aquatique se transforme en une grenouille respirant à la surface. Cette transition écologique, réminiscente de la période périnatale chez les mammifères, s'accompagne de changements spectaculaires (régime alimentaire, organes locomoteurs, système respiratoire...). Ces modifications morphologiques et physiologiques nécessitent la réponse concertée à un signal hormonal, les HTs, de différents tissus vers des destin parfois opposés : apoptose (dans la queue), prolifération (dans les pattes), et remodelage (dans les intestins et le système nerveux central).

Toutefois, la synchronisation de la réponse des différents tissus fait appel à d'autres signaux hormonaux, et notamment les GCs. Ces derniers sont également les médiateurs principaux de la réponse au stress. Les processus endocriniens de la métamorphose et la réponse au stress sont fortement couplés. Les GCs peuvent ainsi jouer le rôle d'interface permettant l'intégration de signaux environnementaux au niveau de réseaux de régulation.

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai analysé les transcriptomes des bourgeons de membres postérieurs et de l'épiderme caudal de têtards de *X. tropicalis* traités ponctuellement avec des HTs et / ou des GCs. La comparaison de ces deux tissus a permis de caractériser la diversité des profils d'expression des gènes cibles des HTs et des GCs. Il en ressort plusieurs résultats majeurs. Tout d'abord, la diversité des profils d'interactions entre ces deux voies est limitée, et la majorité des types de profils sont communs aux deux tissus. Indépendamment du tissu, certains profils sont caractéristiques de fonctions biologiques spécifiques comme le remodelage de la matrice extracellulaire et le système immunitaire. Les gènes impliqués dans ces fonctions communes aux deux tissus sont cependant différents. Enfin, plusieurs facteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN sont régulés par les deux hormones.

Abstract

Amphibian metamorphosis is the rapid and irreversible process during which an aquatic tadpole transforms into an air breathing adult frog. This ecological transition, reminiscent of the mammalian perinatal period, comes with spectacular changes (diet, locomotor organs, respiratory system...). These morphological and physiological modifications necessitate the properly timed response to a single hormonal signal, the thyroid hormones (TH), in various tissues to lead them to sometimes opposite fates : apoptosis (in the tail), cell proliferation and differentiation (in the limbs) and remodeling (in the intestine and the central nervous system).

However, TH do not act alone. In particular, glucocorticoids (GC) play important roles during this process. They also are the main mediator of the stress response. Endocrine processes of the metamorphosis and the stress response are deeply intertwined. GC can thus act as an interface to integrate environmental inputs into regulatory networks.

During my doctorate, I analyzed the possible transcriptional crosstalks between TH and GC in two larval tissues : the tailfin (TF) and the hindlimb buds (HLB). Comparing these two tissues allowed me to characterize the diversity of TH and GC target gene expression profiles. This resulted in several major results. First, the diversity of the profiles of crosstalk between these two pathways is limited, and the majority of the types of profiles is common to both tissues. Next, independently of the tissues, some profiles are characteristic of specific biological functions such as extracellular matrix remodeling and the immune system. Yet, the genes involved in these shared functions are different between the TF and the HLB. Finally, several factors involved in DNA methylation are subject to a crosstalk between the two hormones.