



HAL
open science

Régulation de l'expression du gène Nr5a1 au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire

Vincent Pacini

► To cite this version:

Vincent Pacini. Régulation de l'expression du gène Nr5a1 au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire. Biologie de la reproduction. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7235 . tel-04009275

HAL Id: tel-04009275

<https://theses.hal.science/tel-04009275>

Submitted on 1 Mar 2023

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 de Paris
École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) – ED 562
Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA) –
Équipe Physiologie de l’Axe Gonadotrope (PAG)

**Régulation de l’expression du gène *Nr5a1* au cours de la
différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire**

Par Vincent PACINI

Thèse de doctorat de Biologie

Spécialité : Reproduction

**Dirigée par Joëlle COHEN-TANNOUDJI
et co-encadrée par David L’HÔTE**

Présentée et soutenue publiquement le 30 Mars 2021

Devant un jury composé de :

Virginie ROUILLER-FABRE, Pr Université de Paris - C.E.A, **Présidente du jury** ;

Pierre VAL, DR CNRS, Unité GRED - Clermont-Ferrand, **Rapporteur** ;

Jean-Marc VANACKER, DR CNRS, ENS – Université de Lyon 1, **Rapporteur** ;

Maëlle PANNETIER, CR INRAE - Université Paris Saclay, **Examinatrice** ;

Joëlle COHEN-TANNOUDJI, Pr Université de Paris - Unité BFA, **Directrice de thèse** ;

David L’HÔTE, MCU Université de Paris - Unité BFA, **Co-encadrant de thèse**.



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Résumé

Régulation de l'expression du gène *Nr5a1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire.

La différenciation du lignage gonadotrope est un processus qui a lieu durant le développement embryonnaire de l'hypophyse. La spécification du lignage gonadotrope est caractérisée par l'apparition du facteur de transcription NR5A1, également appelé SF-1, marqueur le plus précoce du lignage gonadotrope. NR5A1 est crucial pour l'émergence du lignage gonadotrope puisqu'il permet d'initier l'expression des gènes codant le récepteur de la GnRH et les sous-unités des hormones gonadotropes, LH et FSH. Des défauts d'expression de *Nr5a1* entraînent, de ce fait, des anomalies de la différenciation du lignage gonadotrope conduisant à un hypogonadisme hypogonadotrope et une stérilité des individus. Malgré l'importance de ce gène, les mécanismes épigénétiques régulant l'émergence de *Nr5a1* lors de la différenciation du lignage gonadotrope restaient mal connus. Les identifier a été l'objet principal de mes travaux de thèse.

Dans un premier temps, j'ai participé à l'identification de l'ensemble des régions régulatrices potentielles au sein du locus de *Nr5a1* par la technique d'ATAC-seq en utilisant un modèle *in vitro* de différenciation des cellules gonadotropes murines. Cette étude a permis de révéler l'existence d'une séquence *cis*-régulatrice intronique de type *enhancer*, jusqu'alors inconnue. J'ai démontré par stratégie CRISPR-Cas9 que cet *enhancer* est strictement nécessaire à l'initiation de l'expression de *Nr5a1* et que son activation est dépendante de la fixation du récepteur nucléaire des œstrogènes ER α . Le recrutement d'ER α sur l'*enhancer* est, en effet, essentiel pour entraîner le remodelage de la chromatine, aussi bien au niveau de l'*enhancer* α que du promoteur de *Nr5a1*, ce qui permet in fine d'activer la transcription du gène. Cette étude a donc permis d'identifier l'élément régulateur le plus précocement impliqué dans la spécification du lignage gonadotrope et souligne, de plus, l'importance d'ER α dans la régulation épigénétique de ce processus de différenciation (Pacini V, *et al.* 2019).

Cependant, comme ER α ne peut pas se fixer sur l'ADN lorsque la chromatine n'est pas permissive, les mécanismes permettant son recrutement sur l'*enhancer* restent à être identifiés. Il a été décrit, dans des tissus non hypophysaires, qu'ER α est recruté à la chromatine par l'intermédiaire de facteurs de transcription particuliers : les facteurs pionniers. Ceux-ci sont capables de se fixer sur une chromatine réprimée et de la remodeler localement, permettant ainsi la fixation d'ER α sur ses séquences cibles. Le recrutement ultérieur de co-activateurs par ER α permet ensuite d'initier l'activation de ces séquences. Afin d'identifier à la fois les co-activateurs d'ER α et les facteurs pionniers dans les cellules gonadotropes immatures, j'ai caractérisé, par immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage haut-débit, l'ensemble des séquences cibles d'ER α (cistrome) dans les cellules gonadotropes. Par une analyse bio-informatique, j'ai identifié, à proximité, des sites de fixation pour de potentiels facteurs pionniers. J'ai entrepris, en parallèle, l'identification de l'interactome protéique d'ER α en mettant en place au laboratoire une technique d'identification par biotinylation proximale (BioID) couplée à la stratégie de quantification protéique en SILAC. Cette étude, encore en cours au laboratoire, a permis d'identifier des partenaires candidats susceptibles d'être des facteurs pionniers ou des co-activateurs essentiels au recrutement d'ER α sur la chromatine ou à son activation, et donc importants dans les processus de différenciation du lignage gonadotrope.

Les résultats obtenus pendant mes travaux de doctorat permettront de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques à l'origine de l'expression du gène *Nr5a1* dans le lignage gonadotrope et, *in fine*, de la différenciation de ce lignage. Les acteurs identifiés dans ces processus seront autant de nouvelles pistes pour mieux caractériser les hypogonadismes hypogonadotropes, encore souvent idiopathiques.

Mots clefs : Gonadotrope, Différenciation, *Nr5a1*, Épigénétique, ER α

Abstract

Regulation of *Nr5a1* gene expression during pituitary gonadotrope cell differentiation.

Gonadotrope differentiation is a stepwise process taking place during pituitary development. The early step of this process is characterized by the expression of the NR5A1 transcription factor, also called SF-1. NR5A1 is a crucial factor for gonadotrope cell fate determination since it initiates the transcription of key gonadotrope genes such as the GnRH receptor and LH and FSH specific subunits. Alterations in *Nr5a1* expression lead to hypogonadotropic hypogonadism and infertility. Despite the importance of NR5A1, the epigenetic mechanisms regulating its expression during early gonadotrope lineage specification are still poorly understood.

We assessed genome-wide chromatin accessibility using ATAC-seq technique in three cell lines recapitulating gradual stages of gonadotrope differentiation and in vivo in developing pituitaries. We highlighted the transient recruitment of a yet undescribed enhancer during gonadotrope specification. Using CRISPR-Cas9 technology, we showed that this enhancer is mandatory for the emergence of *Nr5a1* expression during gonadotrope specification. Furthermore, we demonstrated that the binding of estrogen receptor α (ER α) on this enhancer is essential for chromatin remodeling of *Nr5a1* enhancer and promoter, leading to RNA polymerase recruitment and transcription of the gene. This study has thus identified the earliest regulatory sequence involved in gonadotrope lineage specification. Moreover, it highlights the key epigenetic role played by ER α in this differentiation process (Pacini V, *et al.* 2019).

However, since ER α cannot bind chromatin when in closed conformation, the molecular mechanisms allowing ER α to activate *Nr5a1* enhancer in gonadotrope cells remain to be determined. It has been described in several cellular models that ER α binding to DNA depends on a class of transcription factors called pioneer factors. Pioneer factors have the ability to bind closed chromatin and induce a local change in chromatin accessibility, leading to the recruitment of ER α on its binding sites. The subsequent recruitment of ER α co-activators will then allow the activation of ER α -dependent transcriptional programs. The second objective of my thesis was thus to identify ER α pioneer factors and co-activators in differentiating gonadotrope cells. Using ChIP-seq assay, we identified all the ER α binding sites (cistrome) in the genome of immature gonadotrope cells. To identify ER α pioneer factors and/or co-activators, we determined, by bioinformatic analyses, the enrichment of transcription factor binding sites located in close proximity of ER α motifs. We conducted, in parallel, the identification of ER α interactome by setting up a state-of-the-art technology based on proximal biotinylation of proteins (BioID) associated with protein quantification by SILAC and MS/MS. This study, still in current investigation in the lab, allowed me to identify ER α protein partners that are *bona fide* candidates as pioneer factors and co-activators.

Results obtained from my PhD work should lead to a better understanding of epigenetic mechanisms regulating the initiation of *Nr5a1* expression in gonadotrope cells and, *in fine*, of gonadotrope cell differentiation. Molecular actors that would be eventually identified may provide potential targets to set up new treatments for idiopathic infertility.

Keywords : Gonadotrope, Differentiation, *Nr5a1*, Epigenetic, ER α

Valorisation des travaux de recherche

Présentation de posters :

2018 :

-35^{ème} congrès de la Société Française de Neuroendocrinologie (SFE), 12-15 septembre 2018, Nancy : « Implication de la signalisation œstrogénique dans la régulation épigénétique du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire », **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D.

-4^{ème} forum de l'Ecole Doctorale BioSPC, 13-14 décembre 2018, Dourdan : « Involvement of estrogenic pathway in regulation of *Sf-1* expression during the differentiation of pituitary gonadotrope lineage », **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D.

Communications à des colloques/congrès avec actes :

2018 :

-Les 2^{ème} journées thématiques de la Société de Neuro-Endocrinologie (SNE), 20-21 septembre 2018, Paris : « Involvement of estrogen signaling pathway in *Sf-1* expression regulation during gonadotrope lineage differentiation », **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D.

2019 :

-43^{ème} colloque de la Société de Neuro-Endocrinologie (SNE), 2-4 octobre 2019, Tours : « ER α -activated pituitary enhancer is mandatory for *Nr5a1* expression during early gonadotrope lineage specification », **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D. **Prix de la meilleure communication orale.**

-3^{ème} édition du colloque GDR ReproSciences, 24-26 avril 2019, Toulouse : « ER α -activated pituitary enhancer is mandatory for *Sf-1* expression during early gonadotrope lineage specification », **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D. **Prix de la meilleure communication orale (présentation de poster).**

2020 :

-Symposium Réseau Québécois en Reproduction (RQR), 9-11 novembre 2020, Québec (à distance) : « Régulation de l'expression du gène *Sf-1*, le marqueur le plus précocement exprimé au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire », **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D.

Publications dans des journaux avec comité de lecture :

2019 :

-« Identification of a pituitary ER α -activated *enhancer* triggering the expression of *Nr5a1*, the earliest gonadotrope lineage-specific transcription factor ». **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D. *Epigenetics & Chromatin* (2019). 12-48.

2020 :

-« ER α orchestre les mécanismes épigénétiques qui déclenchent l'expression du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire ». **Pacini V**, Petit F, Quérat B, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J, L'Hôte D. *Medecine/Science* (2020) ; 36 : 562-565.

LE TEMPS

Dans le temps,

On avait le temps de prendre son temps,
Le temps de grandir,
Le temps de marcher, le temps de sourire,
Le temps de prier et de réfléchir,
Le temps de conter tant de souvenirs,
Le temps de chanter, le temps de vieillir,
Le temps de s'aimer et de mourir.

A présent,

L'Homme tout le temps,
Court après le temps,
Il n'a plus le temps, de perdre son temps.

Et pourtant,

Il arrive un temps, où la mort l'attend.

Remerciements

Je tiens à remercier **Joëlle Cohen-Tannoudji**, ma directrice de thèse, pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Merci tout d'abord de m'avoir accueilli au sein du laboratoire depuis ce stage de première année de master, où ce parcours a commencé. Tu as été d'une grande écoute et d'un grand soutien tout au long de ces cinq dernières années et tu continues à l'être, ce pour quoi je tiens particulièrement à te remercier. Ta bienveillance est quelque chose qui m'aura marqué, et pour laquelle je te serais toujours reconnaissant.

Je tiens également à remercier **David L'Hôte**, mon co-directeur de thèse, qui m'a toujours soutenu depuis mon arrivée au laboratoire. C'est le moment de pouvoir te dire (avec pudeur, tu es mon directeur quand même!) à quel point je suis admiratif, et travailler avec toi a été un réel plaisir. Je n'aurai, à mon sens, jamais pu espérer meilleur directeur de thèse que toi, tout simplement. Ça peut paraître simple, mais ça veut dire beaucoup pour moi.

À vous deux, Joëlle et David. Vous avez été les piliers pour moi dans ce laboratoire. Malgré tout, vous avez toujours été là pour moi. Tout ce parcours, ce travail (de recherche et de rédaction de mémoire notamment, je sais que vous vous en souviendrez sûrement autant que moi) n'aurait jamais été possible sans vous, vraiment. Merci à vous de m'avoir accompagné pendant ces cinq dernières années.

Je tiens également à remercier chaleureusement les membres du jury de thèse qui ont acceptés d'évaluer mon travail :

- Madame **Virginie Rouiller-Fabre**, présidente du jury,
- Monsieur **Jean-Marc Vanacker**, rapporteur de ce manuscrit,
- Monsieur **Pierre Val**, rapporteur de ce manuscrit,
- Madame **Maelle Pannetier**, examinatrice de ce manuscrit.

Je remercie **l'ensemble des membres de l'équipe de Biologie Fonctionnelle et Adaptative** pour tous ces moments partagés avec vous. Merci notamment pour toutes ces pauses café, carburant essentiel pour commencer (et continuer) la journée ! Vous allez pouvoir faire, à mon avis, des économies de café...

Merci à « **Chantaaaaalllll** », pour ta gentillesse, ton écoute, ton attention. Tu sais que ça n'est pas tombé dans l'oreille d'un sourd, et que l'on se reverra en Martinique, alors sois prête !

Merci à **Tina**, pour ton attention et ton soutien à mon égard. Je te remercie d'avoir été là notamment dans les moments difficiles.

Merci à **Bruno**, pour ton écoute, ces discussions et ces conseils que tu as pu me donner. Je te souhaite (en avance) de pouvoir profiter pleinement de la retraite qui approche, et d'autant plus en Bretagne ! Tu vas bien finir par y passer plus de temps qu'à Paris.

Merci à **Marie** et **Victoria**, sans qui ce parcours n'aurait pas été aussi agréable. Je vous remercie pour toutes ces discussions, votre écoute, et de m'avoir supporté.

Merci à **Florence « Pitite »**, à ta bonne humeur rayonnante, à toutes ces discussions dans le bureau. Tu as laissé un grand vide quand tu es partie, mais « Joie de vivre » !!

Une note particulière pour **Ambra** et **Coralie**, sans qui la vie au laboratoire n'aurait pas été la même (et ne l'a plus été après coup). À tous ces moments passés avec vous, tous ces cafés et ces discussions (plus tordues les unes que les autres aussi).

Pour faire simple, je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagné et soutenu au cours de ces trois années de doctorat.

Je suis obligé (sous la contrainte évidemment) de remercier **Laura** et **Margaux**, sans qui je ne serais probablement pas arrivé jusqu'ici (ou du moins pas de manière aussi agréable on va dire). Merci pour tous ces moments, ces discussions, ces rires, votre soutien.

Merci à **Orianne**, qui a toujours été à mes côtés depuis le début et qui continue de l'être, dans les bons comme les moins bons moments. Je n'ai pas besoin d'en dire beaucoup car tu sais tout.

Merci à **ma famille** d'être toujours là pour moi, malgré tout. Merci à **mes parents**, pour tout ce qu'ils font pour moi, et merci à **mon frère** d'être présents. C'est le moment de leur dire à quel point je les aime.

Merci à **mes grands-parents**, qui ne sont plus là aujourd'hui. Vous représentez tant de choses pour moi, et vous me manquez toujours autant. Je vous aime.

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	10
<i>Liste des figures et table</i>	13
<i>Préambule</i>	15
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	16
1. Les mécanismes de régulation de la transcription génique	16
1.1 Les séquences <i>cis</i> -régulatrices de la transcription génique	16
1.1.1 Les promoteurs : séquences <i>cis</i> -régulatrices proximales	16
1.1.2 Les <i>enhancers</i> : séquences <i>cis</i> -régulatrices distales essentielles à l'expression génique	18
1.2 Les mécanismes épigénétiques régulant la transcription des gènes	20
1.2.1 La chromatine, organisation structurale de l'ADN	21
1.2.2 Modulation de l'accessibilité de l'ADN par les mécanismes épigénétiques.....	22
1.2.2.1 Les modifications post-traductionnelles des histones.....	22
1.2.2.2 La méthylation des dinucléotides cytosine-guanine de l'ADN.....	24
1.3 Contrôle épigénétique des séquences régulatrices de la transcription des gènes	25
1.3.1 La transcription des gènes : les séquences <i>cis</i> -régulatrices actives	25
1.3.2 La répression transcriptionnelle : inactivation des séquences <i>cis</i> -régulatrices	27
1.4 Les facteurs pionniers : <i>trans</i> -régulateurs déterminants pour la différenciation cellulaire	29
2. Les cellules gonadotropes hypophysaires : actrices essentielles de la fonction de reproduction chez les mammifères	33
2.1 L'hypophyse : centre de contrôle hormonal de l'organisme.....	33
2.2 Organisation anatomique et fonctionnelle de l'hypophyse	33
2.2.1 La neurohypophyse ou hypophyse nerveuse.....	33
2.2.2 L'adénohypophyse ou hypophyse glandulaire	34
2.3 La fonction de reproduction chez les mammifères	36
2.3.1 Régulations hormonales au sein de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique	36
2.3.2 Qu'est-ce qu'une cellule gonadotrope hypophysaire ?	38
3. Organogenèse de l'hypophyse et différenciation des cellules gonadotropes hypophysaires	40
3.1 Différenciation embryonnaire de l'hypophyse chez la souris.....	40
3.1.1 Organogenèse hypophysaire embryonnaire précoce	40
3.1.2 Gradients morphogénétiques et facteurs de transcription associés.....	41
3.2 Facteurs de transcription et différenciation des lignages endocrines.....	43
3.3 Les mécanismes moléculaires de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire ..	44
3.3.1 Les modèles d'études <i>in vitro</i> de la différenciation du lignage gonadotrope	44
3.3.1.1 La lignée α T1-1 : des cellules « progénitrices ».....	45
3.3.1.2 La lignée α T3-1 : des cellules gonadotropes « immatures »	45
3.3.1.3 La lignée L β T2 : des cellules gonadotropes « matures »	45
3.3.2 Les facteurs de transcription de la différenciation gonadotrope	46
3.3.2.1 Gonadotrope ou thyroïdienne ? Le rôle de la balance GATA2-PIT-1.....	46
3.3.2.2 FOXL2, un activateur de la différenciation du lignage gonadotrope	48
3.3.2.3 Combinatoires de facteurs de transcription : exemple de la régulation du gène <i>Gnrhr</i>	49
3.3.2.4 NR5A1, un gène majeur de la différenciation du lignage gonadotrope.....	51

4. Expression et régulation de Nr5a1	52
4.1 Ontogenèse et expression tissulaire de NR5A1	52
4.1.1 Découverte et description succincte de NR5A1	52
4.1.2 Expression et rôles de NR5A1 chez la souris	52
4.2 Régulation de l'expression de Nr5a1	53
4.2.1 Description du locus de Nr5a1	54
4.2.2 Les différentes séquences cis-régulatrices de Nr5a1	54
4.2.2.1 Apport des modèles de souris transgéniques	54
4.2.2.2 Les enhancers de Nr5a1.....	55
- L'enhancer FLE, spécifique des cellules de Leydig fœtales	55
- L'enhancer FAdE, spécifique des cellules surrénaliennes fœtales	56
- L'enhancer VMHE, spécifique des neurones du VMH	57
- L'enhancer PGE, spécifique des cellules gonadotropes hypophysaires	57
II. OBJECTIFS	59
III. RÉSULTATS PUBLIÉS : Identification d'un nouvel enhancer activé par ERα et impliqué dans l'initiation de l'expression de Nr5a1 dans le lignage gonadotrope.	60
Introduction et résultats principaux de l'article	60
Article 1 : « <i>Identification of a pituitary ERα-activated enhancer triggering the expression of Nr5a1, the earliest gonadotrope lineage-specific transcription factor</i> ». Pacini V, et al. <i>Epigenetics & Chromatin</i> , 2019	64
.....	89
Article 2 : « <i>ERα orchestre les mécanismes épigénétiques qui déclenchent l'expression du gène Sf-1 au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire</i> ». Pacini V, et al. <i>Medecine/Science</i> , 2020	90
.....	91
IV. RESULTATS NON PUBLIÉS. Caractérisation des mécanismes moléculaires activant l'enhancer α de Nr5a1 dans les cellules gonadotropes hypophysaires.	95
Introduction :	95
Partie 1. Étude en système rapporteur des conséquences de délétions ou mutations de l'enhancer α sur son activité trans-activatrice	96
Partie 2. Identification du cistrome d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1.	98
Partie 3. Identification des partenaires protéiques d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1.	103
1. Introduction	103
2. Mise au point de la technique BioID et résultats.....	104
2.1 Établissement des clones stables	104
2.2 Marquage des protéines par la méthode SILAC.....	105
2.3 Marquage des partenaires d'ER α par la biotine et précipitation	106
2.4 Résultats préliminaires	106
Matériel et méthodes	111
Culture cellulaire :	111
Système rapporteur luciférase :	111
Immunoprécipitation de la chromatine d'ER α et séquençage massif :	111
Identification par biotinylation proximale (BioID) des partenaires protéiques d'ER α :	112

• Génération de lignées cellulaires α T3-1 sur-exprimant ER α fusionnée à la biotine ligase miniTurbo :	112
• Biotinylation des protéines dans les lignées α T3-1 miniTurbo :	113
• Identification et quantification des peptides en condition SILAC (Stable Isotope Labeling with amino acids in cell culture) :	113
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	115
1. La régulation de l'expression de <i>Nr5a1</i> au cours de la différenciation gonadotrope serait dépendante d'un jeu d' <i>enhancers</i>	115
2. Quels sont les mécanismes de l'activation de l' <i>enhancer</i> α ?	117
2.1 Identification des partenaires nécessaires à l'activité d'ER α	117
2.2 Mécanismes d'activation de l' <i>enhancer</i> α <i>in vivo</i> ?	119
3. Mécanismes moléculaires de l'inactivation de l' <i>enhancer</i> α	120
4. Mobilisation de l' <i>enhancer</i> α à nouveau à l'âge adulte	121
VI. CONCLUSION GÉNÉRALE	123
VII. BIBLIOGRAPHIE	124

Liste des abréviations

• Les gènes sont indiqués en italique et débutent par une majuscule pour les gènes murins (*Nr5a1*) ou en majuscules pour les gènes humains (*NR5A1*). Les protéines désignées sont notées en majuscules (NR5A1).

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ATAC-seq	Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing
BioID	Proximity-dependant biotinylation identification
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BP	Base Pair
BRD4	Bromodomain-Containing Protein 4
CGA	Chorionic Gonadotrophin Subunit Alpha
ChIP-seq	Chromatin Immunoprecipitation using sequencing
CMV	Cytomegalovirus
COMPASS	Complex of proteins associated with Set1
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CRISPR-Cas9	Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9
CTCF	CCCTC-Binding factor
DNMT	DNA Methyltransferase
EARN	<i>enhancer</i> -derived ARN
ERα	Estrogen Receptor α
ERE	Estrogen Response Element
ESR1	Estrogen Receptor 1
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FAdE	Fœtal Adrenal Enhancer
FGF8	Fibroblast Growth Factor 8
FLE	Fœtal Leydig Enhancer
FOXA1	Forkhead Box A1

FOXL2	Forkhead box protein L2
FP	Facteur(s) Pionniers
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
FSHB	Follicle Stimulating Hormone Subunit Beta
FT	Facteur(s) de Transcription
GATA-RE	GATA-Responsive Element
GATA	GATA Binding Protein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GnRHR	Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor
Hygro	Hygromycine
H3K4me1	mono-méthylation (me1) de la lysine 4 (K4) de l'histone H3
H3K4me3	tri-méthylation (me3) de la lysine 4 (K4) de l'histone H3
H3K27ac	acétylation de la lysine 27 (K27) de l'histone H3
H3K27me3	tri-méthylation (me3) de la lysine 27 (K27) de l'histone H3
ISL1	ISL LIM Homeobox 1
JPC	Jours post-conception
KBP	Kilo Base Pair
KDA	Kilo Daltons
LH	Luteinizing Hormone
LHB	Luteinizing Hormone Subunit Beta
LHX3	LIM Homeobox 3
LIRE	LIM Responsive Element
MLL	Mixed-Lineage Leukemia protein
NEUROD	Neuronal Differentiation
NLS	Nuclear Localization Sequence
NR5A1	Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A member 1
PAX7	Paired Box 7

PBX1	PBX Homeobox 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE	Pituitary Gonadotrope Enhancer
PIC	Preinitiation Complex
PITX	Paired Like Homeodomain
PIT-1	Pituitary Transcript Factor 1
PRC	Polycomb Repressor Complex
PRL	Prolactine
PROP1	Prophet of PIT-1
PTM	Post-Translational Modification
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SF-1	Steroidogenic Factor-1
SHH	Sonic Hedgehog
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acid in Cell Culture
SV40	Simien Virus 40
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TBX	T-Box Transcription Factor
TET	Ten-Eleven Translocation
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TSS	Transcription Star Site
VMH	Ventro-Médial Hypothalamus
VMHE	VMH Enhancer
WNT	Wingless
αGSU	α -Glycoprotein Hormone Subunit
3C	Chromosome Conformation Capture
5mC	5-methylcytosine

Liste des figures et table

- Figure 1.** Représentation schématique d'une séquence promotrice d'un gène.
- Figure 2.** Les *enhancers*, séquences distales *cis*-régulatrices de la transcription des gènes.
- Figure 3.** Illustration de la régulation de l'expression génique par les *enhancers*.
- Figure 4.** De l'ADN aux chromosomes.
- Figure 5.** Identification des régions accessibles de la chromatine par la technique d'ATAC suivi de séquençage haut-débit.
- Figure 6.** Identification des modifications post-traductionnelles des histones par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine.
- Figure 7.** La méthylation des dinucléotides CpG de l'ADN, un mécanisme réprimant la transcription.
- Figure 8.** Représentation simplifiée des marques épigénétiques des histones associées aux séquences *cis*-régulatrices de type *enhancers* ou promoteurs.
- Figure 9.** Mécanisme d'action des facteurs pionniers dans l'initiation de la transcription des gènes.
- Figure 10.** Organisation de l'hypophyse dans l'espèce humaine.
- Figure 11.** La neurohypophyse.
- Figure 12.** L'adénohypophyse.
- Figure 13.** L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique.
- Figure 14.** Développement embryonnaire de l'hypophyse murine.
- Figure 15.** Gradients morphogénétiques de molécules signalisatrices et expression des facteurs de transcription au sein de l'hypophyse chez le rongeur.
- Figure 16.** Distribution topographique des différents types cellulaires endocrines de l'adénohypophyse chez la souris.
- Figure 17.** Caractérisation des trois lignées modèles de cellules gonadotropes murines immortalisées.
- Figure 18.** Contrôle de la différenciation des cellules endocrines hypophysaires de l'adénohypophyse par les facteurs de transcription GATA2 et PIT-1.
- Figure 19.** Localisation cellulaire de NR5A1 dans ses différents tissus d'expression chez la souris.
- Figure 20.** Description du locus du gène *Nr5a1* chez la souris.
- Figure 21.** Les différentes séquences *cis*-régulatrices de type *enhancer* de *Nr5a1* identifiées chez la souris.
- Figure 22.** L'*enhancer* gonadotrope hypophysaire PGE.
- Figure 23.** ER α est nécessaire pour le maintien de l'état d'hypométhylation des dinucléotides CpG de l'ADN de l'*enhancer* α de *Nr5a1*.
- Figure 24.** Analyse de l'effet des différentes délétions et mutations de la séquence de l'*enhancer* α sur son activité.
- Figure 25.** Identification et analyse des différents sites de fixation d'ER α (cistrome) dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1.
- Figure 26.** Analyse de l'enrichissement en sites de fixation pour des facteurs de transcription sur les différentes classes du cistrome d'ER α .
- Figure 27.** Schématisation de la technique d'identification des partenaires protéiques endogènes d'ER α par la stratégie de biotinylation proximale (BioID).
- Figure 28.** Élaboration de lignées cellulaires α T3-1 sur-exprimant ER α fusionné à la *biotine ligase* miniTurbo.

Figure 29. Mise en place expérimentale du marquage et de l'identification des protéines proches d'ER α par approche de BioID couplée à la stratégie de quantification SILAC.

Figure 30. Résultats préliminaires d'identification des partenaires protéiques d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1.

Figure 31. Réseau d'interactions physiques entre les différents partenaires d'ER α identifiés dans notre étude.

Table 1. Amorces utilisées pour les clonages dans le vecteur luciférase.

Les figures ont été en partie réalisées à l'aide de l'outil en ligne BioRender (<https://biorender.com/>).

Préambule

Au cours de mes travaux de doctorat, je me suis intéressé aux mécanismes initiant l'expression du gène *Nr5a1* pendant la maturation du lignage gonadotrope. J'ai étudié notamment les mécanismes épigénétiques qui concourent à spécifier l'expression de ce gène important pour la différenciation de ce lignage hypophysaire. Dans une première partie d'introduction de ce manuscrit, je détaillerai donc l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes de régulation de l'expression génique, en mettant l'accent sur les mécanismes épigénétiques et les séquences régulatrices de type *enhancer*. Dans une seconde partie, après quelques rappels sur la régulation de la fonction de reproduction chez les mammifères, j'aborderai le phénomène de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire et ses mécanismes. Enfin, j'exposerai les résultats de mes travaux, publiés (Pacini V, *et al. Epigenetics & Chromatin*, 2019) ou non.

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Les mécanismes de régulation de la transcription génique

La majorité des cellules d'un organisme donné (à l'exception des leucocytes et des gamètes) ont le même génome qui ne s'exprime cependant pas de la même manière dans chacune d'entre elles. En effet, chacun des environ 200 types cellulaires existants (adipocytes, neurones, fibroblastes, cellules gonadotropes...) chez l'humain ou chez la souris expriment spécifiquement un répertoire de gènes qui définit l'identité de chaque type cellulaire et ses fonctions. L'expression des gènes est finement régulée à deux niveaux : le niveau transcriptionnel regroupant schématiquement les mécanismes modulant la fréquence de présence et d'activité de l'ARN Polymérase II, et le niveau post-transcriptionnel regroupant les mécanismes régulant la maturation et la stabilité du transcrit. Dans ce premier chapitre, j'aborderai uniquement les mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription des gènes, en développant essentiellement des exemples de régulation impliqués dans la différenciation cellulaire au cours du développement.

1.1 Les séquences *cis*-régulatrices de la transcription génique

1.1.1 Les promoteurs : séquences *cis*-régulatrices proximales

Il est difficile de définir la notion de gène dans l'absolu car celle-ci varie selon qu'on l'aborde sous un angle de génétique formelle (le gène est alors un objet mathématique), sous l'angle fonctionnel (une protéine qui assure une fonction) ou encore sous l'angle de sa structure. Ce dernier angle, qui nous intéresse ici, définit le gène comme la séquence d'ADN comprise entre le site d'initiation de la transcription (*Transcription Star Site* ou TSS) et le site de polyadénylation. A cette séquence d'ADN, succession d'exons et d'introns qui s'étend parfois sur plusieurs milliers de paires de bases (kilo paires de bases ou *kilo base pair*, kbp) s'ajoutent des séquences *cis*-régulatrices de l'expression génique. On définit les promoteurs comme les séquences *cis*-régulatrices localisées directement en amont du TSS. Leur fonction est d'initier et participer à la régulation de la transcription des gènes (Lenhard B, *et al.* 2012). Il faut noter que près de la moitié des gènes contiendrait plus d'un promoteur (Carninci P, *et al.* 2006 ; Kimura K, *et al.* 2006 ; Baek D, *et al.* 2007 ; Tsuritani K, *et al.* 2007). On parle alors de promoteurs alternatifs. La présence de promoteurs alternatifs n'entraîne cependant pas nécessairement de modification de la séquence codante, mais peut simplement modifier la

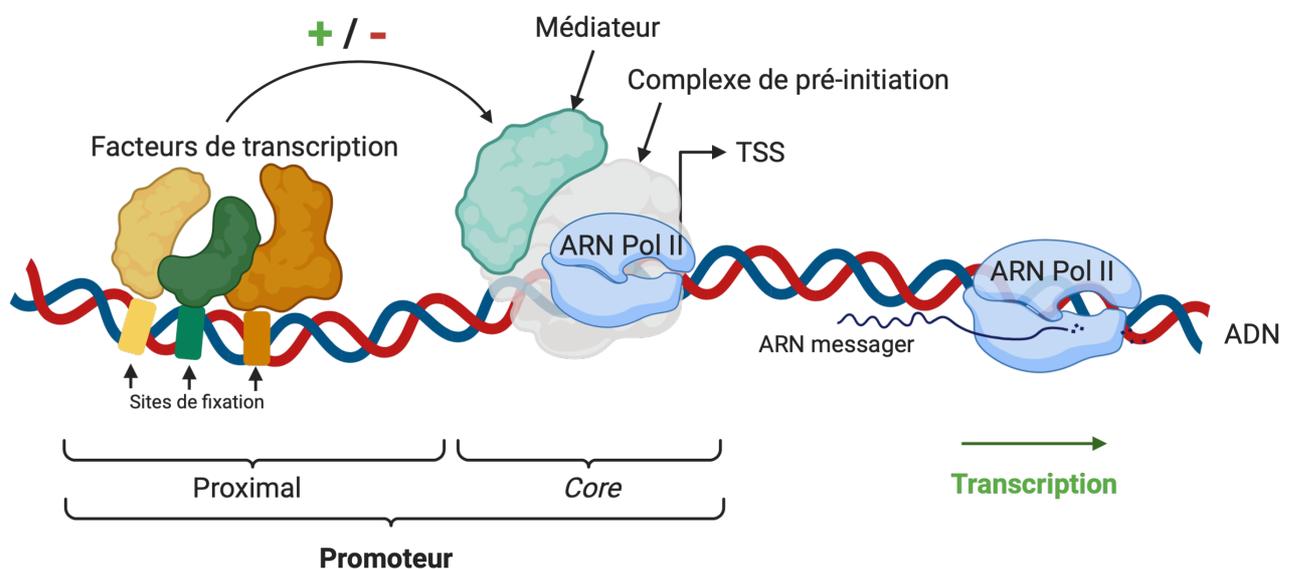


Figure 1. Représentation schématique d'une séquence promotrice d'un gène. Tous les gènes sont caractérisés par la présence d'au moins un promoteur, nécessaire pour l'initiation de la transcription. Ces séquences promotrices sont toutes constituées de deux régions distinctes : le promoteur *core* et le promoteur proximal. Le promoteur *core*, localisé sur environ quatre-vingt paires de bases (bp) autour du site d'initiation de la transcription (TSS) du gène, est crucial pour la fixation de la machinerie de transcription, composé du complexe de pré-initiation – comprenant l'ARN polymérase II (ARN Pol II) – et du complexe Médiateur. Le promoteur proximal est une séquence d'environ 500 à 1500 bp, composée de multiples sites de fixation pour des facteurs qui vont réguler le recrutement et l'association des complexes de la machinerie de transcription. Lorsque la machinerie de transcription est activée, l'ARN Polymérase II va pouvoir transcrire le gène et synthétiser l'ARN messager associé.

séquence non codante 5' UTR (*5' Untranslated Transcribed Region*) des transcrits et donc leur stabilité ou leur taux de traduction. L'existence de promoteurs multiples permet de moduler plus finement l'expression des gènes, notamment au cours du développement, ou en restreindre l'expression à certains tissus (Landry J-R, *et al.* 2003 ; Davuluri R V, *et al.* 2008).

On considère que les promoteurs sont constitués de deux régions distinctes (Figure 1) :

- Le promoteur dit *core*, qui s'étend sur environ quatre-vingts bp autour du TSS. Il existe différentes classes de promoteur *core*, caractérisées par la présence de séquences spécifiques (comme par exemple la célèbre TATA box, pour revue : Smale S T et Kadonaga J T, 2003). Ces promoteurs partagent tous la même fonction essentielle qui est la fixation du complexe de pré-initiation (PIC) nécessaire à la transcription. Ce complexe est composé de l'ARN Polymérase II et de ses très nombreux facteurs généraux associés (Sainsbury S, *et al.* 2015). Le PIC s'associe de plus à un second complexe appelé Médiateur. Ce complexe, composé de plusieurs dizaines de protéines, est essentiel à la structuration du complexe d'initiation de la transcription et jouerait le rôle de véritable protéine d'échafaudage permettant le rapprochement des différentes séquences *cis*-régulatrices et des facteurs de transcription (FT, Conaway J W, *et al.* 2005 ; Malik S et Roeder R G, 2005).

- Au promoteur *core* s'ajoute le promoteur dit proximal, une séquence de taille variable, allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de bp (il est admis qu'un promoteur proximal est constitué de 500 à 2000 bp). Ce promoteur proximal est localisé directement en amont du *core*. Il contient de nombreux sites de fixation pour des FT qui peuvent réguler positivement ou négativement le recrutement du complexe d'initiation de la transcription. Le promoteur proximal est donc essentiel pour initier la transcription (Pabo C O et Sauer R T, 1992 ; Ptashne M et Gann A, 1997). Les FT interagissent non seulement avec la séquence d'ADN mais aussi entre eux ce qui fait que ce sont de véritables combinatoires de FT qui concourent à la régulation de l'expression génique (Lemon B et Tjian R, 2000).

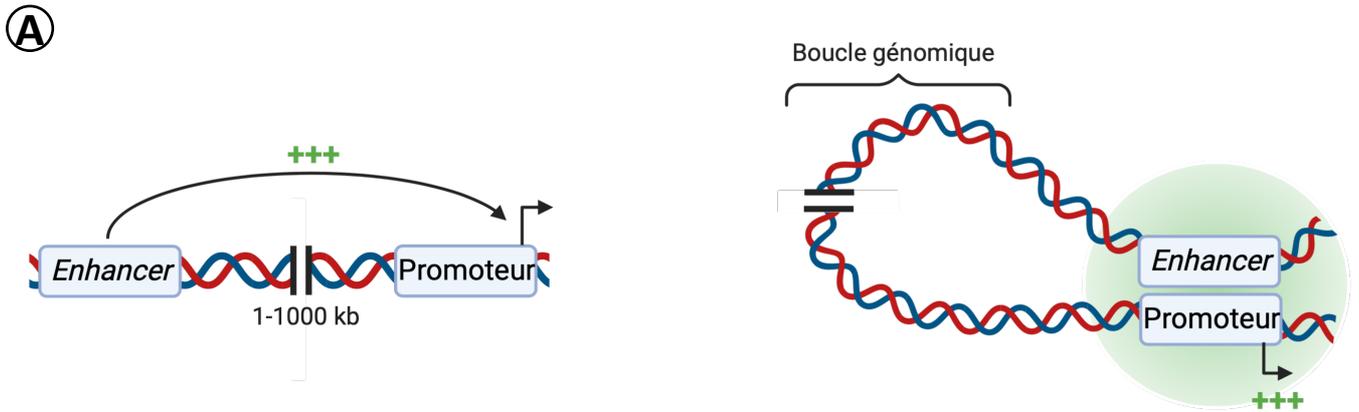
Longtemps, seul l'impact des promoteurs sur l'expression génique a fait l'objet d'études. Ceci s'explique probablement par le fait que les séquences *cis*-régulatrices situées à proximité du TSS ont été les premières séquences caractérisées dans le génome. La révolution génomique structurale puis fonctionnelle a permis d'identifier des séquences *cis*-régulatrices dénommées distales, car situées à distance du TSS, qui participent, parfois de façon prépondérante, à la régulation de l'expression des gènes. Il faut donc maintenant considérer, en plus des séquences

promotrices, ces autres séquences *cis*-régulatrices distales, qui peuvent être localisées très en amont ou en aval du TSS. Parmi celles-ci, on trouve les *insulators*, les *silencers* ou les *enhancers*. Les *insulators* sont des séquences qui, comme leur nom l'indique, isolent les différentes parties fonctionnelles du génome afin d'éviter que la régulation d'un gène perturbe celle du gène adjacent (pour revue : Gaszner M et Felsenfeld G, 2006). Les *silencers* et les *enhancers* sont des séquences distales qui respectivement inhibent ou activent la transcription génique. Les techniques de génomique fonctionnelle ont démontré le rôle majeur des *enhancers* dans l'initiation et la régulation de l'expression des gènes, notamment ceux du développement et de la différenciation cellulaire.

1.1.2 Les *enhancers* : séquences *cis*-régulatrices distales essentielles à l'expression génique

Les *enhancers* sont de petites séquences génomiques (d'environ 200 à 1500 bp), localisées très majoritairement dans des régions non codantes du génome (introniques et intergéniques) et pouvant être situées jusqu'à plusieurs kbp de distance en amont ou en aval du TSS du gène qu'elles régulent (Krivega I et Dean A, 2012 ; Pennacchio L A, *et al.* 2013). Ces *enhancers* ont pour rôle d'augmenter le niveau de transcription du gène qui leur est associé. Ils sont donc considérés comme étant les « promoteurs des promoteurs » et permettent notamment d'initier l'expression des gènes lors de la différenciation cellulaire ou de spécifier leur expression dans les tissus cibles. Par exemple, l'expression de *Shh* (*Sonic Hedgehog*) chez la souris, un facteur essentiel pour le développement des membres, est sous le contrôle majeur de l'*enhancer* ZRS (localisé à plus d'1 méga bp de son promoteur). La délétion de cet *enhancer* chez la souris ou ses mutations chez l'humain perturbent voire abolissent l'expression de *Shh* dans les bourgeons de membres, conduisant à une dégénérescence locale du squelette (Lettice L A, *et al.* 2003 ; Sagai T, *et al.* 2005). Un autre exemple est le syndrome de surdité de *Gusher* lié à l'X qui est la conséquence de mutations d'un *enhancer* du gène *POU3F4* (*POU Class 3 Homeobox 4*), localisé à environ 900 kbp de ce gène (de Kok Y J, *et al.* 1996). Certaines agénésies pancréatiques sont également liées à des mutations d'un *enhancer*, celui de *PTF1A* (*Pancreas Associated Transcription Factor 1a*) localisé à 25 kbp du gène (Weedon M N, *et al.* 2014). Enfin, des mutations d'un *enhancer* régulant l'expression de *TBX5* (*T-Box Transcription Factor 5*), un facteur essentiel pour le développement du cœur, entraînent spécifiquement des malformations cardiaques (Smemo S, *et al.* 2012).

La régulation de la transcription des gènes par les *enhancers* est complexe d'une part car un *enhancer* peut contrôler la transcription de plusieurs gènes (Mohrs M, *et al.* 2001) et, d'autre



B Capture de Conformation Chromatinienne (3C) :

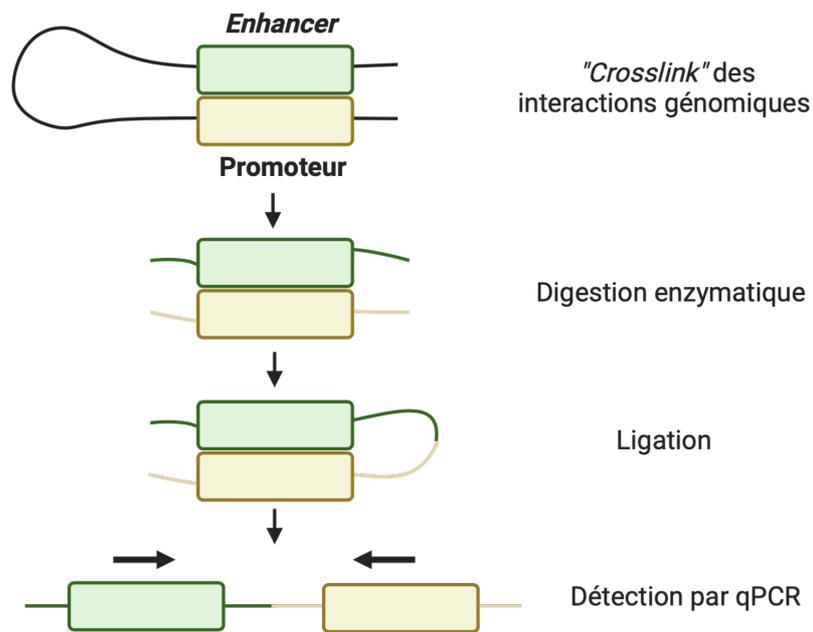


Figure 2. Les *enhancers*, séquences distales *cis*-régulatrices de la transcription des gènes. A. Les *enhancers* sont des séquences *cis*-régulatrices localisées à distance du gène cible (de 1 à 1000 kbp) dont ils régulent positivement la transcription (représentation linéaire à gauche). Ils agissent par interaction directe avec le promoteur du gène régulé qui est rendue possible par la formation d'une boucle génomique (représentation 2D à droite). **B.** Les interactions entre deux régions génomiques peuvent être identifiées par la technique de Capture de Conformation Chromatinienne (3C). Brièvement, les interactions génomiques, notamment celles entre les *enhancers* et les promoteurs représentés ici, sont stabilisées par mise en place de liaisons (« *crosslink* »). Les régions qui interagissent sont isolées par digestion enzymatique suivie d'une ligation des coupures générées par la digestion. Les interactions génomiques sont ensuite détectées par PCR quantitative (qPCR), en utilisant des amorces positionnées sur chacune des séquences génomiques d'intérêt (→ et ←).

part, car la transcription d'un gène donné peut être régulée par un jeu de plusieurs *enhancers* (Corradin O, *et al.* 2014). La combinaison de plusieurs *enhancers* pour la régulation d'un gène permettrait non seulement une plus grande finesse de régulation, à la fois dans l'espace et dans le temps, mais aussi de garantir l'expression des gènes, en particulier lors de processus critiques comme l'embryogenèse.

Comme nous venons de le voir, les *enhancers* jouent un rôle essentiel sur l'activité du promoteur et donc l'expression génique en étant pourtant localisés souvent loin du promoteur qu'ils régulent. L'interaction entre les *enhancers* et promoteurs des gènes est rendue possible par la formation de boucles de repliement de l'ADN appelées *loopings* (Blackwood E M et Kadonaga J T, 1998 ; Bulger M et Groudine M, 1999 ; de Laat W, *et al.* 2008) (Figure 2A). Ces *loopings* ont été mis en évidence par le développement de techniques permettant d'analyser la conformation chromatinienne et de détecter les interactions physiques entre deux régions distales du génome (pour revue : de Wit E et de Laat W, 2012). Les étapes clés de l'une de ces techniques, appelée Capture de Conformation Chromatinienne (*Chromosome Conformation Capture* ou 3C), sont résumées dans la Figure 2B.

Tout comme les promoteurs, les *enhancers* contiennent des sites de fixation pour des FT. Parmi ces facteurs, certains sont impliqués dans la formation et/ou la stabilisation du *looping* pour l'interaction promoteur/*enhancer* (Vakoc C R, *et al.* 2005 ; Ren X, *et al.* 2011 ; Yun W J, *et al.* 2014). D'autres facteurs, activateurs, permettent le recrutement de facteurs essentiels de la machinerie de transcription (Szutorisz H, *et al.* 2005 ; Song S-H, *et al.* 2007). Les *enhancers* participent donc à la formation du complexe de pré-initiation nécessaire à la transcription génique. Enfin, de façon intéressante, il a été démontré que l'ARN Polymérase II transcrit de petits ARN non codants, appelés *eARN* (*enhancer-derived ARN*), à partir de la séquence même des *enhancers*. Le rôle de ces *eARN* reste controversé, une hypothèse étant qu'ils pourraient contribuer à la régulation transcriptionnelle, notamment en stabilisant l'interaction *enhancer*-promoteur (pour revue : Natoli G et Andrau J-C, 2012 ; Liu F, 2017) (Figure 3).

Parmi les FT susceptibles de se fixer sur les *enhancers* se trouvent les récepteurs nucléaires et notamment les récepteurs des hormones stéroïdes. Les études épigénomiques du rôle des récepteurs nucléaires dans la régulation de l'expression des gènes ont permis de révolutionner le dogme de leur mode d'action. Alors que l'idée longtemps admise était que les récepteurs nucléaires se fixent sur les promoteurs des gènes et stimulent ainsi leur transcription, les

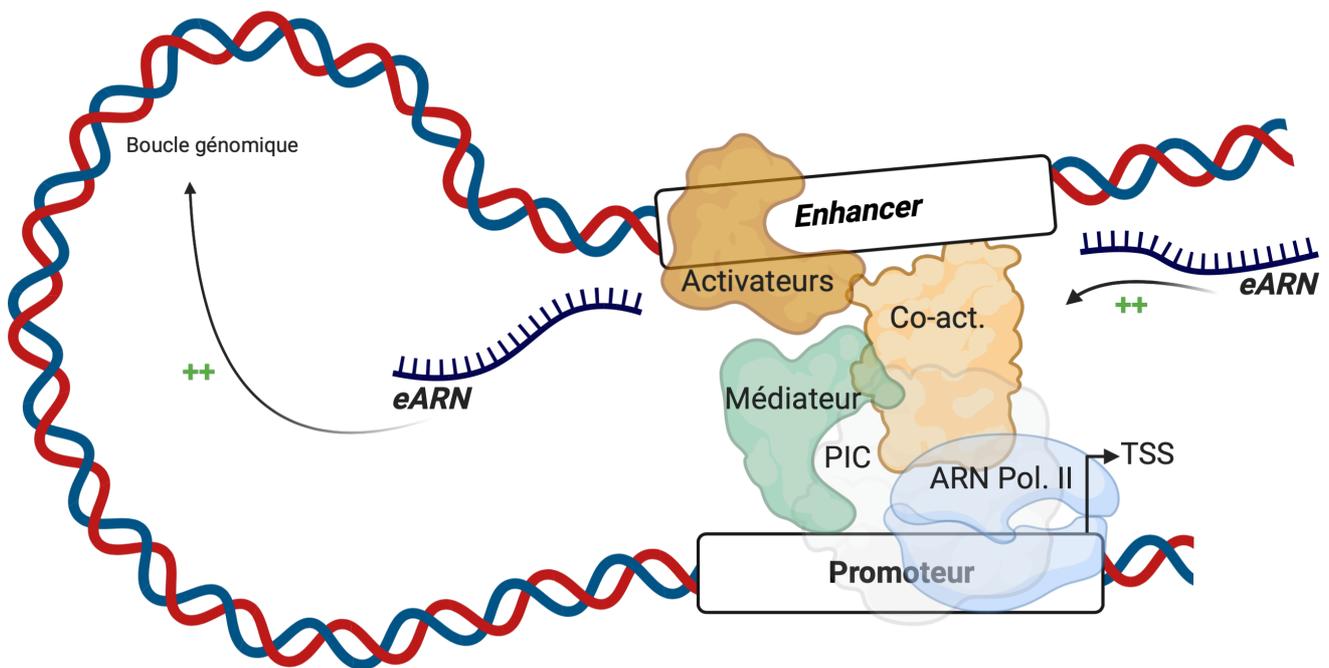


Figure 3. Illustration de la régulation de l'expression génique par les *enhancers*. Sur des *enhancers* se fixent des facteurs de transcription, parmi lesquels des « activateurs », qui permettent le recrutement notamment de co-activateurs de la transcription (Co-act.). Ces co-activateurs sont impliqués dans le remodelage de la chromatine et dans le recrutement des complexes protéiques de la machinerie de la transcription : le complexe Médiateur, et le complexe de pré-initiation (PIC) comprenant l'ARN polymérase II (ARN Pol. II). Il a d'ailleurs été suggéré que les *enhancers* pourraient être directement responsables du recrutement de ces deux complexes protéiques et de leur transport jusqu'aux séquences promotrices des gènes. De plus, l'ARN Polymérase II serait aussi recrutée au niveau des séquences *enhancers* et entrainerait la production d'ARN messagers d'*enhancers* (*eARN*). Le rôle de ces *eARN*, encore discuté, serait de participer à la stabilisation du recrutement des complexes protéiques à la fois sur l'*enhancer* et le promoteur, et ainsi à la formation de la boucle génomique promoteur/*enhancer*.

analyses épigénomiques ont révélé que l'essentiel de leurs sites fonctionnels de fixation se trouvent sur des *enhancers*. Ces études menées en particulier sur le modèle du récepteur de type α des oestrogènes (ER α , *Estrogen Receptor α*) mettent, en effet, en évidence que plus de 80% des sites de fixation d'ER α dans les cellules utérines de souris sont des sites distaux des promoteurs (Hewitt S C, *et al.* 2012). Des données similaires ont été obtenues dans d'autres tissus comme, par exemple, dans la glande mammaire (Palaniappan M, *et al.* 2019). La signalisation œstrogénique conduit, en effet, à l'activation par ER α d'un répertoire d'*enhancers* ce qui conduit à modifier le transcriptome des cellules cibles des œstrogènes et contrôle ainsi le développement et la différenciation terminale de la glande mammaire (Manavathi B, *et al.* 2014). Ce mode d'action d'ER α a été impliqué non seulement dans des conditions physiologiques mais aussi dans des processus de cancérogenèse hormono-dépendants de cette glande (Flach K D et Zwart W, 2016).

Jusqu'à récemment, l'identification des *enhancers* n'était pas chose aisée car la séquence complète des génomes et, plus encore, la nature moléculaire de la chromatine associée aux séquences régulatrices n'étaient pas connues. L'essor de la génomique fonctionnelle a grandement facilité leur identification. Je vais donc maintenant aborder les mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation de l'activité des *enhancers* et de la transcription des gènes, en détaillant certaines des techniques que j'ai utilisées au cours de mon travail de thèse.

1.2 Les mécanismes épigénétiques régulant la transcription des gènes

Classiquement, on définit comme épigénétique l'ensemble des mécanismes qui affectent l'expression génique sans modification de la succession des bases de la séquence ADN. Les modifications épigénétiques peuvent consister en des altérations chimiques de l'ADN, comme par exemple la méthylation des cytosines mais aussi et surtout en des modifications post-traductionnelles (*post-translational modifications* ou PTM) des protéines majeures de la chromatine, les histones. L'ensemble des PTM des histones, qui sont multiples et variées, constitue ce que l'on appelle le code histone. Ces PTM, combinées avec la méthylation de l'ADN, modulent le degré de compaction locale des séquences régulatrices définissant l'accessibilité de la chromatine. Ceci module ainsi le recrutement de facteurs (enzymes de modification de la chromatine, FT...) et *in fine* l'expression génique. Dans le chapitre qui va

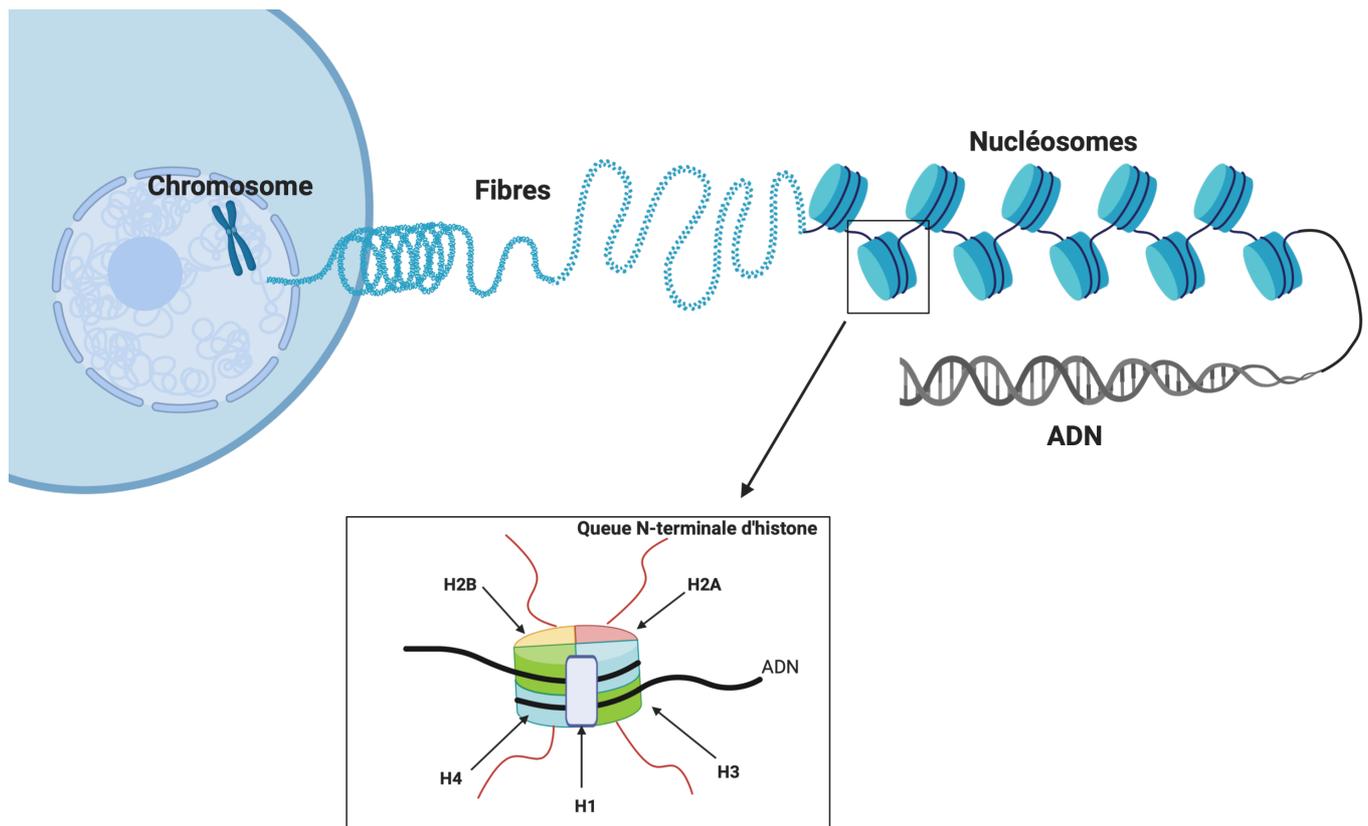


Figure 4. De l'ADN aux chromosomes. L'ADN, une séquence de nucléotides double brin, est complexé avec des protéines histones. Cette structure forme le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine qui permet la compaction de l'ADN. La compaction de ces nucléosomes entraîne la formation de fibres de chromatine, aboutissant *in fine* à l'ultrastructure des chromosomes que l'on retrouve dans le noyau des cellules eucaryotes. Un nucléosome (détail dans l'encadré), est composé de deux dimères de protéines histones (H2A-H2B et H3-H4), chargées négativement, qui permettent la compaction d'environ 146 bp d'ADN chargé positivement. Cette compaction de l'ADN est également maintenue par une protéine histone H1, appelé histone *linker*, nécessaire pour la compaction en fibre des nucléosomes. La queue N-terminale des protéines histones est localisée en dehors du cœur du nucléosome, et peut subir des modifications post-traductionnelles.

suivre, j'aborderai les différents mécanismes épigénétiques qui régulent l'activité des séquences *cis*-régulatrices et notamment des *enhancers*.

1.2.1 La chromatine, organisation structurale de l'ADN

Dans le noyau des cellules eucaryotes, la longue et fragile double hélice d'ADN est structurée en complexes avec des protéines pour former l'unité fondamentale de la chromatine, les nucléosomes (Figure 4). Les nucléosomes se constituent par interaction électrostatique entre un octamère de protéines histones (deux dimères d'histones H3-H4 et H2A-H2B) chargées positivement et une séquence d'environ 146 bp d'ADN chargée négativement (Luger K, *et al.* 1997). En moyenne, les nucléosomes sont localisés environ toutes les 200 ± 40 paires de bases et sont reliés entre eux par une courte séquence d'ADN (*ADN linker*) et la protéine histone H1 (*histone linker*). Le degré de compaction de la chromatine influence l'organisation globale des chromosomes au cours du cycle cellulaire mais régule aussi localement la transcription (Tremethick D J, 2007). La structuration en nucléosomes du génome participe donc non seulement à sa stabilité, mais constitue aussi la première barrière empêchant l'interaction de l'ADN avec les FT (Elgin S C, 1988 ; Gross D S et Garrard W T, 1988). Il existe donc des mécanismes permettant l'éviction locale des nucléosomes de façon à rendre l'ADN accessible à la machinerie de réplication, de réparation de l'ADN, mais également de la transcription des gènes.

Il est ainsi possible, en identifiant les régions accessibles de la chromatine, d'identifier les régions *cis*-régulatrices actives du génome qui sont caractérisées par une déstructuration locale des nucléosomes, rendant l'ADN accessible aux FT. Plusieurs méthodes ont été mises au point afin de caractériser l'accessibilité d'une région génomique et ainsi d'identifier les séquences régulatrices potentielles au sein du génome (pour revue : Tsompana M et Buck M J, 2014). Ces méthodes reposent sur l'utilisation d'enzymes à activité nucléasique (Deoxyribonuclease I (DNase), Micrococcal nuclease (MNase) ou encore la Tn5 Transposase), qui coupent préférentiellement les séquences accessibles de la chromatine, couplée à l'identification des séquences clivées par PCR ou séquençage massif. Parmi les différentes méthodes, l'ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing* ; Buenrostro J D, *et al.* 2013) se distingue par son efficacité et sa relative simplicité. Elle présente, de plus, l'avantage de pouvoir être mise en œuvre sur un très petit nombre de cellules (500 minimum). Cette technique repose sur l'utilisation de la transposase hyper-active Tn5 qui, après fixation sur les séquences d'ADN accessibles, opère un simple clivage puis entraîne la transposition de séquences

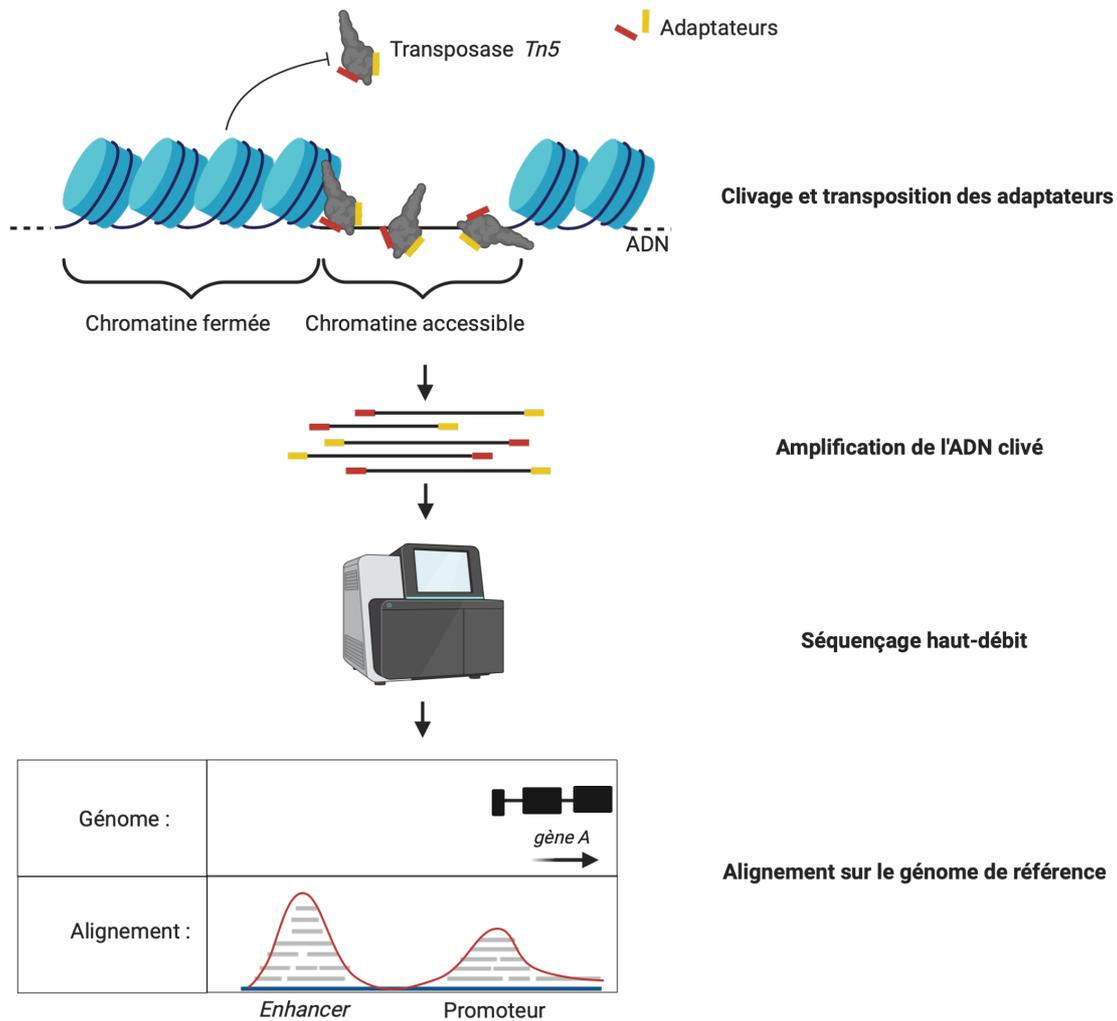


Figure 5. Identification des régions accessibles de la chromatine par la technique d'ATAC suivi de séquençage haut-débit. Les régions *cis*-régulatrices actives de la chromatine sont caractérisées par une déplétion en nucléosomes et sont identifiables par des techniques comme l'ATAC (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin*). Cette technique repose sur l'utilisation d'une transposase hyper-active, la Tn5, chargée avec des séquences adaptatrices (adaptateurs, en rouge et jaune). Cette enzyme va se fixer sur les régions accessibles de la chromatine, les cliver et y transposer les séquences adaptatrices. L'ADN clivé sera amplifié avant d'être identifié par séquençage haut-débit. Les régions d'ADN génomique amplifiées et séquencées, représentées par des traits gris, sont ensuite alignées sur le génome de référence afin de caractériser l'accessibilité des promoteurs et des séquences *cis*-régulatrices distales comme les *enhancers*, représentée ici. La hauteur des pics reflète l'ouverture de la chromatine.

adaptatrices permettant le séquençage massif des fragments d'ADN. A l'issue d'une telle expérience, on obtient donc, pour l'ensemble du génome d'un type cellulaire donné, toutes les régions accessibles de la chromatine, incluant les promoteurs, les *insulators*, les *silencers* et les *enhancers* (Figure 5).

L'accessibilité en elle-même ne suffit pas pour identifier la nature de la séquence régulatrice. Pour cela, il existe deux grandes approches :

1- La localisation dans le génome. Les génomes d'espèces modèles sont maintenant bien caractérisés et la majorité des gènes (au moins ceux codant des protéines) sont connus et annotés sur les génomes. Si la région accessible se situe de façon adjacente au TSS d'un gène connu, alors cette région est un promoteur. Si elle est éloignée d'un TSS connu, cette région est probablement un *insulator* ou un *enhancer/silencer*. Les *insulators* se caractérisant par la présence d'un site de liaison pour le facteur CTCF (*CCCTC-Binding Factor*), il est donc possible de distinguer les *insulators* des *enhancers/silencers*.

2- Les marques d'histone. Les régions du génome se caractérisent par la présence spécifique de certaines PTM d'histone que l'on appelle plus communément marques d'histone. Comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, les promoteurs sont enrichis en histone H3 tri-méthylée sur la lysine 4 (H3K4me3), alors que les *enhancers* sont décorés avec l'histone H3 mono-méthylée sur la lysine 4 (H3K4me1). De façon intéressante, le code histone est l'un des mécanismes prépondérants dans la modulation de l'accessibilité de la chromatine.

1.2.2 Modulation de l'accessibilité de l'ADN par les mécanismes épigénétiques

L'accessibilité de l'ADN aux FT est modulée par des mécanismes épigénétiques, parmi lesquels on trouve les PTM des histones et la méthylation de l'ADN.

1.2.2.1 Les modifications post-traductionnelles des histones

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les histones, parties intégrantes des nucléosomes, représentent la première barrière pour l'accès de la machinerie de transcription des gènes à l'ADN (Lyer V R, 2012 ; Ballaré C, *et al.* 2013). Les histones sont des protéines composées d'un domaine C-terminal globulaire, localisé à l'intérieur du nucléosome et permettant la dimérisation des histones, et d'une extrémité N-terminale située en dehors du nucléosome. Les extrémités N-terminales sont donc facilement accessibles aux enzymes du nucléoplasme et peuvent subir de nombreuses PTM (Luger K, *et al.* 1997). Ces PTM d'histone sont de nature diverse : méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitinylation,

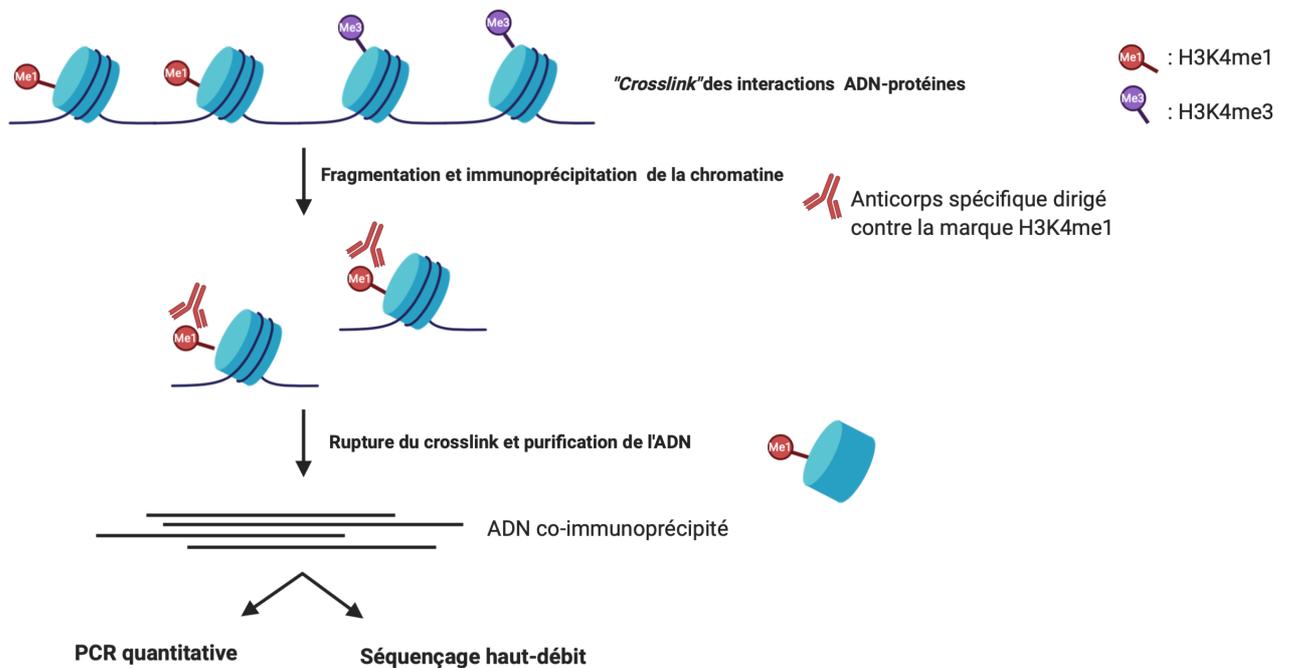


Figure 6. Identification des modifications post-traductionnelles des histones par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Les protéines histones des nucléosomes ont des queues N-terminales, situées à l'extérieur du cœur du nucléosome, sont cibles de modifications post-traductionnelles. Ces modifications post-traductionnelles, comme les marques de mono-méthylation ou de tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (respectivement, H3K4me1 et H3K4me3) représentées ici, forment le code histone permettant de caractériser les différentes séquences génomiques. La technique classiquement utilisée pour identifier la localisation de ces modifications post-traductionnelles est l'immunoprécipitation de la chromatine. Brièvement, les interactions ADN-protéines sont stabilisées par la formation de liaisons covalentes induites par le formaldéhyde (« *crosslink* »). L'ADN est fragmenté avant d'effectuer l'immunoprécipitation de la chromatine associée à une marque épigénétique donnée à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette marque épigénétique (ici, un anticorps reconnaissant spécifiquement la marque H3K4me1). Après rupture des liaisons entre ADN et protéines, l'ADN co-immunoprécipité qui était associé à la protéine d'intérêt est purifié puis identifié par PCR quantitative ou séquençage haut-débit.

sumoylation, ADP ribosylation, déamination, propionylation et butyrylation (Kouzarides T, 2007 ; Bannister A J et Kouzarides T, 2011 ; Kebede A F, *et al.* 2015). Elles s'opèrent par modifications covalentes des résidus lysine, arginine, sérine, thréonine ou tyrosine des extrémités N-terminales des histones par l'intermédiaire d'un jeu important d'enzymes. Les PTM sont, de plus, des modifications dynamiques et réversibles, mises en place par des enzymes appelées *writers* comme les HAT (*Histone Acetyltransferase*) ou les HMT (*Histone Methyltransferase*) et retirées par des enzymes dénommées *erasers* comme les protéines HDAC (*Histone deacetylase*) ou KDM (*Lysine demethylase*).

Ces PTM d'histones peuvent agir de deux manières. Elles modifient « physiquement » la stabilité des nucléosomes et par ricochet l'accessibilité de l'ADN (Bannister A J et Kouzarides T, 2011 ; Rothbart S B et Strahl B D, 2014). Ainsi, l'acétylation de histones induit des phénomènes de répulsion électrostatique entre deux histones et entre histones et ADN, déstructurant localement les nucléosomes. A ces phénomènes purement physiques, s'ajoutent des mécanismes plus biologiques. Les marques d'histone peuvent, en effet, recruter des facteurs spécifiques, appelés *readers*, traduisant les modifications d'histones. Par exemple, l'acétylation des histones recrute la protéine à homéodomaine BRD4 (*Bromodomain-Containing Protein 4*) qui serait à son tour potentiellement impliquée dans la modulation de l'accessibilité de la chromatine (Jiang G, *et al.* 2020).

Le code histone est certes impliqué dans la régulation de l'accessibilité de la chromatine mais il est aussi impliqué dans la caractérisation fonctionnelle des différents types de régions génomiques (promoteurs, *enhancers/silencers*, *insulators*, phases ouvertes de lectures, séquences actives, inactives...). Ces différentes séquences sont, en effet, enrichies préférentiellement en certains types de PTM d'histone.

La technique classique pour étudier la répartition d'une marque de la chromatine le long du génome est actuellement l'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage massif (ChIP-seq ; Figure 6). Brièvement, les interactions chromatiniennes entre l'ADN et les protéines histones sont stabilisées par un traitement au formaldéhyde puis la chromatine est fragmentée par sonication. Les fragments d'ADN interagissant avec une histone portant une marque particulière sont purifiés par immunoprécipitation avec un anticorps dirigé spécifiquement contre cette modification. Enfin, l'ADN co-immunoprécipité est identifié par séquençage à haut-débit (Milne T A, *et al.* 2009) ce qui permet de connaître la distribution sur

le génome de la marque d'histone étudiée. La répartition d'une marque donnée dans un type cellulaire particulier contribue à la caractérisation de l'épigénome de la cellule.

Ces dernières années, avec la démocratisation des techniques de séquençage massif, un nombre croissant et conséquent d'épigénomes ont été publiés. Les projets internationaux *ENCODE* (*Encyclopedia of DNA Elements consortium* ; The ENCODE Project Consortium, 2007 et 2012) et *Roadmap Epigenomics Project* (Roadmap Epigenomics Consortium, 2015), en définissant des standards d'analyse et en réunissant l'ensemble des épigénomes pour un grand nombre de types cellulaires humains et murins, ont permis de faire émerger les grands principes de l'épigénomique fonctionnelle. Il a ainsi été établi, par exemple, que :

- Les phases ouvertes de lectures transcrites sont marquées par la présence de H3K36me3
- Les séquences *cis*-régulatrices actives sont souvent enrichies en histones, et notamment histone H3, acétylées sur le résidu lysine 27 (H3K27ac) et présentent, dans cette situation, une accessibilité de la chromatine.
- Les promoteurs sont très souvent enrichis en H3K4me3 alors que les *enhancers* sont enrichis en H3K4me1 (voir plus en détail en §1.3)

1.2.2.2 La méthylation des dinucléotides cytosine-guanine de l'ADN

Une seconde catégorie de modifications épigénétiques pouvant affecter l'activité de la chromatine est la méthylation de l'ADN. Il s'agit de l'ajout d'un groupement méthyl (CH₃) sur le cinquième carbone des cytosines (5mC : 5-methylcytosine) localisées dans un complexe de dinucléotides symétriques CpG (où « p » correspond à la liaison phosphate entre les nucléotides cytosine, C, et guanine, G). Ce contexte dinucléotidique est très souvent regroupé localement en « îlots » CpG notamment au niveau des séquences régulatrices des gènes (Zemach A, *et al.* 2010 ; Feng S, *et al.* 2010).

La méthylation de l'ADN est associée à la répression transcriptionnelle des gènes, indépendamment de la densité de méthylation des dinucléotides CpG (Ben-Hattar J et Jiricny J, 1988 ; Watt F et Molloy P L, 1988 ; Iguchi-Arigo S M et Schaffner W, 1989). Ce mécanisme est impliqué dans les processus de régulation de l'expression génique au cours du développement embryonnaire (Holliday R et Pugh J E, 1975 ; Borgel J, *et al.* 2010), de l'empreinte parentale génique (Bajrami E et Spiroski M, 2016), de l'inactivation du chromosome X chez la femelle (Riggs A D, 1975) ou encore dans la répression des séquences répétées du génome (Jones P A, 2012). La méthylation de l'ADN peut agir de deux manières :

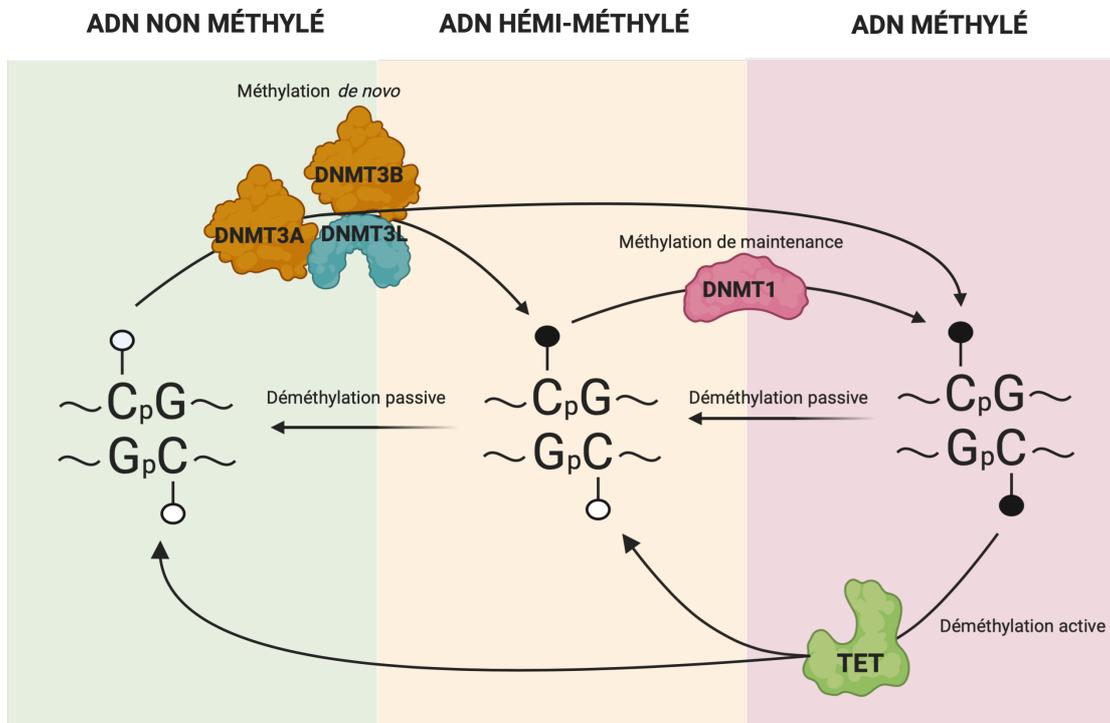
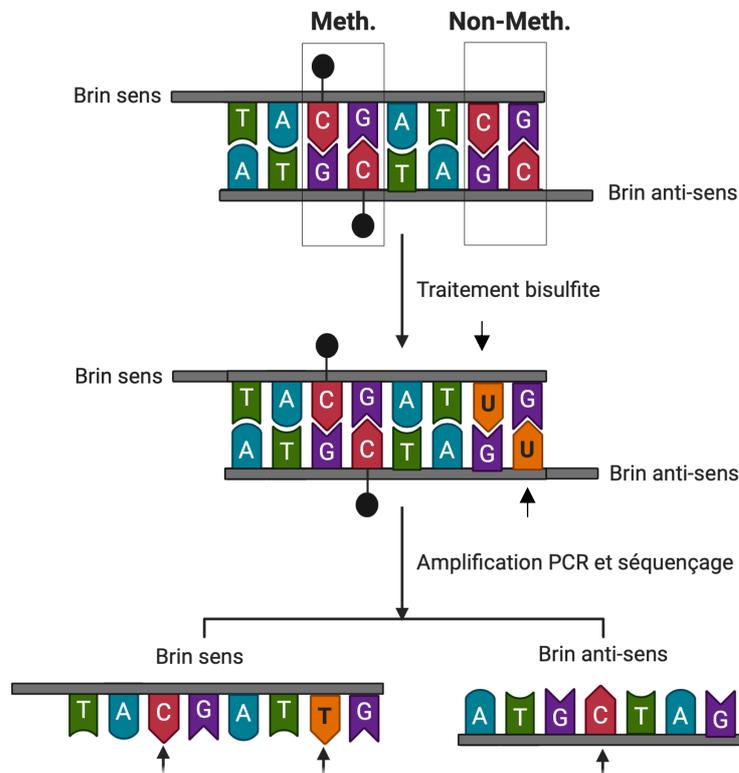
A**B**

Figure 7. La méthylation des dinucléotides CpG de l'ADN, un mécanisme réprimant la transcription. A. La méthylation de l'ADN est une modification chimique qui s'effectue sur les cytosines localisées dans un contexte de dinucléotides Cytosine-Guanine (CpG, où « p » représente la liaison phosphate entre les nucléotides cytosines, C, et guanine, G). La méthylation de l'ADN est médiée par des enzymes de la famille des DNMT (*DNA methyl transferase*) : DNMT3A et DNMT3B, et leur co-facteur DNMT3L, qui permet la méthylation *de novo*, tandis que DNMT1 maintient la méthylation au cours de la réplication qui est dite méthylation de maintenance. La méthylation de l'ADN est un processus réversible, qui peut être éliminé par éviction passive du groupement méthyl pendant la réplication, par exemple, ou de façon active par les enzymes de la famille TET (*Ten Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase*) (Figure adaptée de Héberlé É et Bardet A F, 2019). **B.** Afin de distinguer les dinucléotides méthylés (Meth., représenté par un rond noir) de ceux non méthylés (Non-Meth.) dans le génome, on effectue un traitement bisulfite de l'ADN génomique. Lorsque les cytosines ne sont pas méthylées, elles sont transformées en nucléotides Uracil (U, marquées par une flèche noire) alors que ce n'est pas le cas lorsqu'elles sont méthylées. Après le traitement, l'ADN génomique est dénaturé puis une PCR est effectuée. Le séquençage des brins d'ADN amplifiés permettra de déterminer si les cytosines localisées dans un contexte nucléotidique de façon génomique (pointée par une flèche noire) étaient méthylées. Les cytosines séquençées correspondent alors à des cytosines méthylées dans le génome, contrairement aux thymines, qui correspondent à des cytosines non méthylées.

1) elle interfère avec la fixation des FT ou 2) elle permet le recrutement de facteurs à domaine MBD (*Méthyl-CpG-Binding Domain*), recrutant des enzymes modificatrices d'histones diminuant l'accessibilité de l'ADN (pour revue : Bogdanović O et Veenstra G J C, 2009). On peut noter que certains FT, notamment ceux de la famille élargie des facteurs à Homeodomain, sont insensibles à la méthylation des cytosines de leur site de liaison et se lieraient indifféremment voire même préférentiellement à des séquences d'ADN méthylées (Yin Y, *et al.* 2017).

Le dépôt de la marque de méthylation de l'ADN est catalysé selon deux procédés par les enzymes de la famille des DNMT (*DNA Methyltransferase*) (Figure 7A) :

- La méthylation de maintenance par l'enzyme DNMT1 sur les brins hémi-méthylés lors de la réplication de l'ADN (Robert M-F, *et al.* 2003).
- La méthylation *de novo* par les enzymes DNMT3A et DNMT3B, et leur co-facteur DNMT3L (Hata K, *et al.* 2002), effectuée sur les brins d'ADN indépendamment de leur statut initial de méthylation (Okano M, *et al.* 1999).

La méthylation de l'ADN est un phénomène réversible, la déméthylation pouvant être catalysée par les enzymes TET (*Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenases*). Ces enzymes vont permettre l'oxydation des 5mC en 5hmC (5-hydroxymethylcytosine) qui sont alors remplacées par des cytosines non méthylées par le système BER (*Base-Excision Repair*) (pour revue : Wu H et Zhang Y, 2014).

L'étude du profil de méthylation de l'ADN est couramment effectuée par un traitement de l'ADN au bisulfite (Figure 7B). Ce traitement permet la conversion des cytosines non méthylées (C) en uracil (U), sans affecter les cytosines méthylées (5mC). L'analyse des séquences génomiques bisulfitées permet donc de connaître l'état de méthylation de l'ADN (Li Y et Tollefsbol T O, 2011).

1.3 Contrôle épigénétique des séquences régulatrices de la transcription des gènes

1.3.1 La transcription des gènes : les séquences *cis*-régulatrices actives

L'activation des séquences *cis*-régulatrices et donc l'initiation de la transcription des gènes est un phénomène séquentiel qui se caractérise par une première étape dite d'amorçage (*priming*) au cours de laquelle la chromatine des séquences *cis*-régulatrices et notamment des *enhancers* va subir des modifications épigénétiques (Månsson R, *et al.* 2007 ; Olsson R, *et al.* 2007)

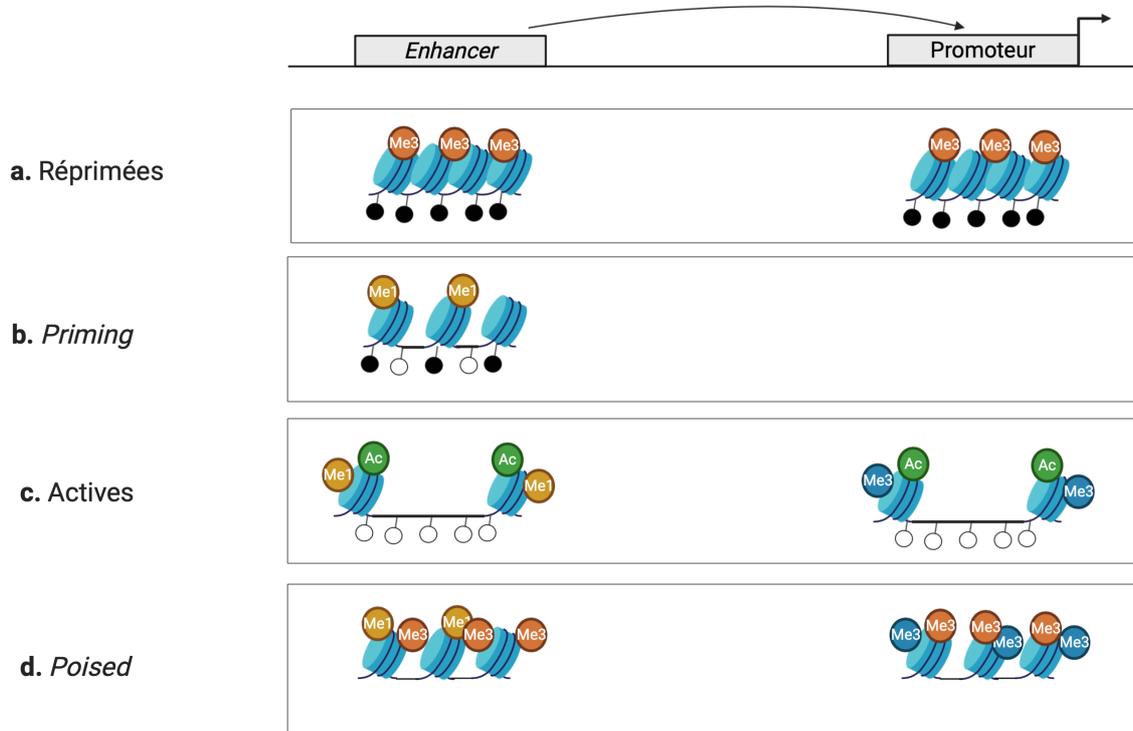


Figure 8. Représentation simplifiée des marques épigénétiques des histones associées aux séquences *cis*-régulatrices de type *enhancers* ou promoteurs. **a.** Les séquences régulatrices des gènes, *i.e.* les promoteurs et les *enhancers*, sont caractérisées par différentes marques épigénétiques d’histones en fonction de leur état d’activité. Les séquences inactives, *i.e.* qui n’entraînent pas de transcription du gène, sont caractérisés par une haute densité de nucléosomes associée à une forte méthylation des dinucléotides CpG de l’ADN. Elle est parfois marquée par la triméthylation de la lysine 27 de l’histone 3, H3K27me3 (Me3, orange), un processus actif d’inactivation des séquences *cis*-régulatrices. **b.** Il est aujourd’hui admis que l’initiation de l’expression d’un gène est caractérisé par un état de pré-marquage des *enhancers*, appelé « *priming* ». Les *enhancers* sont ainsi marqués par une réduction locale de leur densité en nucléosomes, une baisse de la méthylation de l’ADN ainsi que par un dépôt caractéristique de la marque épigénétique H3K4me1 (Me1, jaune). Les caractéristiques épigénétiques des promoteurs associés ne sont pas clairement définis. **c.** L’activation des *enhancers* est caractérisée par une déplétion des nucléosomes, une déméthylation de l’ADN, et le dépôt caractéristique de la marque d’acétylation H3K27ac (Ac, vert). Les promoteurs seront caractérisés par ces mêmes marques, mais à la place de H3K4me1, ils sont marqués par H3K4me3 (Me3, bleu). **d.** Les séquences régulatrices peuvent aussi se retrouver dans un état de « pré-activation », dit « *poised* ». Elles sont alors caractérisées par une combinaison de marques activatrices caractéristiques de leur séquence (H3K4me1 pour les *enhancers* et H3K4me3 pour les promoteurs) associés à des marques épigénétiques caractéristiques des séquences réprimées comme H3K27me3.

(Figure 8B). Les *enhancers* vont en effet être marqués par le dépôt caractéristique de la mono-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1) (Heintzman N D, *et al.* 2007). Ce dépôt est catalysé par les enzymes histones méthyltransférases du complexe COMPASS (*Complex of Proteins Associated with Set1*) (Malik S et Bhaumik S R, 2010) et plus précisément par les enzymes MLL3/4 (*Mixed-Lineage Leukemia protein 3/4*, Lee J-E, *et al.* 2013 ; Wang C, *et al.* 2016). On ignore encore beaucoup de choses sur les mécanismes qui permettent le recrutement des MLL sur les futurs *enhancers* encore « nus », mais des travaux suggèrent que les facteurs pionniers (dont nous reparlerons par la suite) puissent en être des acteurs importants (Jozwik K M, *et al.* 2016). Une fois décoré par H3K4me1, les *enhancers* sont considérés comme « primés » mais demeurent toutefois inactifs. En effet, contrairement à d'autres modifications post-traductionnelles d'histones, la mono-méthylation seule ne permet pas de modifier directement la stabilité des nucléosomes. Elle participe cependant au recrutement de co-facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine (Flanagan J F, *et al.* 2005 ; Local A, *et al.* 2018). Le dépôt de H3K4me1 inhibe aussi la fixation d'histones désacétylases et, au contraire, favorise le recrutement d'histones acétyltransférases comme P300/CBP (*CREB Binding protein*) (Wang C, *et al.* 2016) (Figure 8C). Cependant, pour que l'activation de l'*enhancer* soit efficace, ces mécanismes doivent être renforcés par le recrutement de FT et de leurs co-facteurs. Les régions actives de la chromatine sont aussi caractérisées par une hypo-méthylation locale des dinucléotides CpG. La fixation des complexes protéiques impliqués dans les processus de méthylation *de novo* (Ooi S K T, *et al.* 2007) ou de maintenance (Nady N, *et al.* 2011) est permise par l'interaction avec les extrémités N-terminales des histone H3. Elle est, au contraire, réprimée par la présence de la méthylation de la lysine 4 de ces histones (Ooi S K T, *et al.* 2007 ; Otani J, *et al.* 2009 ; Zhang Y, *et al.* 2010). De plus, certains FT interagissent avec les enzymes de déméthylation TET, participant ainsi à la déméthylation des séquences *cis*-régulatrices.

L'activation complète d'un *enhancer* est un mécanisme complexe faisant entrer de nombreux partenaires interdépendants. Par exemple, les *enhancers* « primés », enrichis en H3K4me1, qui possèdent un site de liaison pour le récepteur des œstrogènes ER α peuvent recruter ce facteur. ER α interagit avec TET2 (Wang L, *et al.* 2018) et participe à l'hypométhylation de l'*enhancer*. ER α recrute aussi l'acétyltransférase P300, ce qui permet d'augmenter l'enrichissement en H3K27ac et l'accessibilité de la chromatine. Cet enrichissement ne sera cependant optimal qu'après le recrutement par ER α de co-facteurs permettant une acétylation maximale (Yi P, *et al.* 2017). L'acétylation en H3K27 (Creyghton M P, *et al.* 2010 ; Rada-Iglesias A, *et al.* 2011) conduira ensuite à la fixation de facteurs comme BRD4 favorisant le recrutement de l'ARN

Polymérase II et du complexe Médiateur (De Santa F, *et al.* 2010 ; Lee J-E, *et al.* 2017) au niveau des *enhancers*. De façon intéressante, ce système est renforcé par un ensemble de boucles positives : par exemple TET2 et ER α participent aussi au renforcement du recrutement de MLL3/4 et donc au maintien de la présence de la marque H4K4me1 sur les *enhancers* (Wang L, *et al.* 2018).

L'activation des *enhancers* peut être modulée à chacune de ces étapes, ce qui offre probablement à la cellule autant de leviers pour réguler finement cette activation et donc l'initiation et le niveau de la transcription des gènes.

Contrairement aux *enhancers*, les séquences promotrices de gènes actifs sont caractérisées par le dépôt de la marque H4K4me3 (Heintzman N D, *et al.* 2007), catalysé par les enzymes SETD1A/1B (*SET Domain Containing 1A/1B*) et MLL1/2 (Andreu-Vieyra C V, *et al.* 2010 ; Bledau A S, *et al.* 2014 ; Denissov S, *et al.* 2014). L'activation du promoteur est également associée à une acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Wang Z, *et al.* 2008) par les histones acétyltransférases comme GCN5 (*General Control Of Amino-Acid Synthesis, Yeast, Homolog-Like 2* ; Bian C, *et al.* 2011), à une hypométhylation des CpG et au recrutement des facteurs associés à la machinerie de la transcription comme l'ARN Polymérase II (Guenther M G, *et al.* 2007 ; Selth L A, *et al.* 2010 ; Wang F, *et al.* 2013) (Figure 8C). Concernant les gènes avec *enhancers*, les mécanismes d'activation de leur promoteur sont largement modulés par le rapprochement physique des *enhancers* avec le promoteur, ce qui permet une expression plus importante du gène (Chepelev I, *et al.* 2012).

1.3.2 La répression transcriptionnelle : inactivation des séquences *cis*-régulatrices

Les séquences *cis*-régulatrices inactives du génome sont caractérisées par une forte densité en nucléosomes : ces régions ne sont donc pas accessibles aux FT. Elles sont généralement associées à une hyper-méthylation des sites CpG de l'ADN. Comme évoqué précédemment, la méthylation elle-même peut inhiber directement la fixation de certains des FT. Mais plus largement, le processus de méthylation de l'ADN contribue à l'inactivation des séquences régulatrices : les DNMT responsables de la méthylation de l'ADN recrutent aussi des co-facteurs inhibiteurs, dont des histones désacétylases, entraînant l'éviction de la marque d'acétylation qui, comme nous l'avons vu, est associée aux séquences régulatrices actives (Fuks F, *et al.* 2000 et 2001 ; Deplus R, *et al.* 2002).

En plus des mécanismes de retrait des marques d'activation, il existe des mécanismes de dépôt de marques d'inhibition (Figure 8A). Les séquences inactives peuvent, en effet, être décorées

également par la marque de tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette marque est notamment impliquée dans la répression transcriptionnelle au cours du développement ainsi que dans l'inactivation du chromosome X (Rougeulle C, *et al.* 2004 ; Bernstein B E, *et al.* 2006). Cette tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est catalysée par le facteur EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) du complexe PRC2 (*Polycomb Repressor Complex 2* ; Kuzmichev A, *et al.* 2002 ; Ferrari K J, *et al.* 2014). Elle permet le recrutement du complexe PRC1, qui va entraîner l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A, favorisant la compaction des nucléosomes (Pasini D, *et al.* 2008). Elle permet également de renforcer la méthylation des CpG l'ADN, puisque EZH2 permet le recrutement des DNMT comme DNMT3A (méthylation *de novo* ; Viré E, *et al.* 2006 ; Rush M, *et al.* 2009).

Enfin les séquences *cis*-régulatrices peuvent être réprimées mais néanmoins dans un état de « prêt à l'emploi » : on parle alors d'état « *poised* » (Figure 8D). Ces *enhancers* sont caractérisés par la présence de la marque caractéristique H3K4me1, en association avec la marque répressive H3K27me3 (Heintzman N D, *et al.* 2007 ; Creyghton M P, *et al.* 2010 ; Voigt P, *et al.* 2013) et une faible accessibilité de la chromatine. Il a été aussi décrit que l'acétyltransférase P300 peut déjà être pré-recrutée sur les *poised enhancers* (par exemple : Krishnakumar R, *et al.* 2016). Ce mécanisme, associant marques d'inhibition et d'activation, permet de réprimer la transcription d'un gène tout en autorisant son activation rapide (Stock J K, *et al.* 2007) par simple éviction de la marque répressive H3K27me3 sous l'action d'enzymes comme JMJD3 (*Jumonji Domain Containing 3*) ou UTX (*Ubiquitously-Transcribed TPR Protein On The X Chromosome* ; Agger K, *et al.* 2007 ; Hübner M R et Spector D L, 2011). La présence de P300 permettra ensuite une acétylation rapide des résidus K27 alors disponibles (Rada-Iglesias A, *et al.* 2011). Ce mécanisme de répression transcriptionnelle est essentiel en particulier pour l'expression des gènes du développement, en permettant la régulation spatiale et temporelle de leur expression (Choukrallah M-A, *et al.* 2015 ; Goode D K, *et al.* 2016 ; Kloet S L, *et al.* 2016). Des dérégulations du complexe Polycomb peuvent ainsi entraîner une activation prématurée des gènes (Mazzarella L, *et al.* 2011) et une altération globale de leur profil d'expression dans l'organisme (Lee H-G, *et al.* 2015).

Un autre mécanisme d'inhibition, plus radical, existe et consiste en le démantèlement des *enhancers* lorsqu'ils ne sont plus nécessaires. Au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires par exemple, les *enhancers* des gènes de la pluripotence peuvent être effacés du répertoire des *enhancers* par éviction complète de la marque H4K4me1 sous l'action d'enzyme

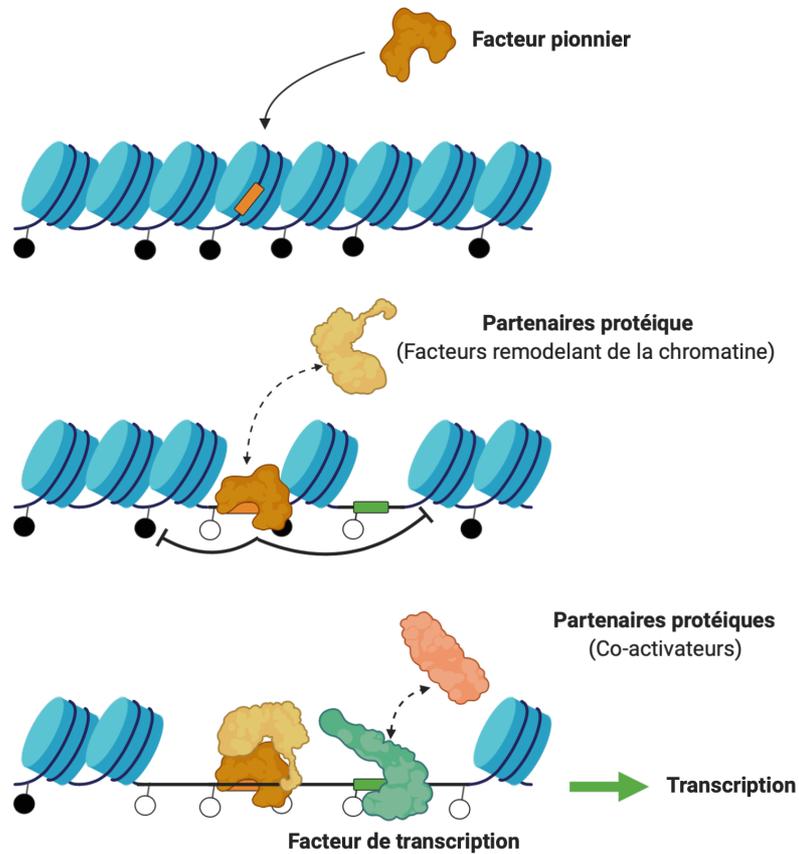


Figure 9. Mécanisme d'action des facteurs pionniers dans l'initiation de la transcription des gènes. La transcription des gènes est initiée par l'action de facteurs d'une classe particulière appelés facteurs pionniers. Contrairement à la plupart des facteurs de transcription, ces facteurs pionniers ont la capacité de reconnaître et fixer des sites localisés dans des régions compactées de la chromatine, où l'ADN peut être méthylé (représenté par des ronds noirs). Les facteurs pionniers vont tout de même se fixer sur leurs sites de liaison malgré le contexte chromatinien défavorable et entraîner une décompaction locale de la chromatine en recrutant notamment des partenaires protéiques comme des facteurs remodelant la chromatine. Ceux-ci vont permettre l'éviction ou le déplacement des nucléosomes ainsi que la déméthylation de l'ADN (représentée par des ronds blancs), rendant accessible les sites de liaison à des facteurs de transcription qui agiront avec des co-activateurs pour initier la transcription.

histones déméthylases comme l'enzyme LSD1 (*Lysine-specific demethylase 1* ; Whyte W A, *et al.* 2012).

L'un des enjeux majeurs dans la compréhension des mécanismes épigénomiques de la différenciation cellulaire est de comprendre comment s'établit le répertoire *d'enhancers* impliqués dans cette différenciation. Il s'agit, en particulier, de comprendre comment une région génomique est identifiée comme étant un futur *enhancer* et comment s'opère son activation.

1.4 Les facteurs pionniers : *trans*-régulateurs déterminants pour la différenciation cellulaire

L'expression successive des gènes au cours de la différenciation cellulaire est sous le contrôle de FT mais la majorité d'entre eux est pourtant incapable de se fixer sur la chromatine réprimée (ADN méthylé, histones non acétylées, faible accessibilité ; Bell O, *et al.* 2011 ; Héberlé É et Bardet A F, 2019). Il est donc conceptuellement difficile de comprendre comment de tels facteurs peuvent identifier et activer un futur *enhancer*. Il existe cependant une classe fonctionnelle particulière de FT regroupant les facteurs dits « pionniers » (FP). Les FP sont exprimés notamment durant les stades précoces du développement embryonnaire au cours desquels ils permettent de diriger la transcription génique associée à la différenciation cellulaire (Iwafuchi-Doi M et Zaret K S, 2014 ; Zaret K S et Mango S E, 2016).

Les facteurs pionniers ont des caractéristiques uniques (Figure 9) :

Contrairement aux FT « classiques », les FP ont la capacité de reconnaître et lier leurs sites de fixation malgré l'environnement non permissif de la chromatine. Les FP sont ainsi capables de se lier sur l'ADN même quand celui-ci est directement masqué par les nucléosomes (Sekiya T, *et al.* 2009 ; Soufi A, *et al.* 2015 ; Zaret K S, *et al.* 2016). On ignore encore quelles sont les caractéristiques biochimiques communes qui permettent à ces facteurs de ne pas être inhibés par l'encombrement stérique due à la présence des nucléosomes. Il a été proposé que cette capacité de fixation serait liée à une mobilité plus faible de ces facteurs dans le compartiment nucléaire. Cependant, cette caractéristique pourrait être la conséquence plutôt que la cause des aptitudes particulières des FP et ne serait pas propre à ces seuls FP (Sekiya T, *et al.* 2009 ; Zaret K S, *et al.* 2016). Enfin parmi les FP, certains sont également connus pour fixer préférentiellement les séquences présentant des CpG méthylés (Hu S, *et al.* 2013 ; Liu Y, *et al.* 2014 ; Yin Y, *et al.* 2017).

Seule une dizaine de FP ont été caractérisés, avec des niveaux de caractérisation très hétérogènes. Parmi les mieux caractérisés, on trouve SOX2 (*SRY-box 2*), OCT4 (*Octamer-Binding Transcription Factor 4*), et FOXD3 (*Forkhead Box D3*), des facteurs modulant la pluripotence ; FOXA1 (*Forkhead Box A1*) et GATA4 (*GATA Binding Protein 4*) impliqués dans la différenciation de nombreux tissus (prostate, épithélium mammaire, hépatocytes...), TCF1 (*Transcription Factor T Cell Factor 1*), activé par la voie Wnt/ β -caténine, impliqué notamment dans la différenciation des cellules T ou encore PBX1 (*PBX Homeobox 1*) impliqué en particulier dans la différenciation des muscles squelettique (pour revue : Iwafuchi-Doi M, 2018). Plus récemment, l'équipe du Dr J. Drouin a identifié PAX7 (*Paired Box 7*) comme étant le FP du lignage mélanotrope hypophysaire (Budry L, *et al.* 2012 ; Mayran A, *et al.* 2018). Enfin, des travaux suggèrent régulièrement que tel ou tel facteur serait un FP, comme par exemple ISL1 (*ISL LIM Homeobox 1*), possible FP de la différenciation des cardiomyocytes (Gao R, *et al.* 2019). Néanmoins, il manque actuellement un consensus sur le minimum de caractéristiques requises pour définir sans ambiguïté un FP, ce qui permettrait de statuer sur les capacités pionnières de près de 2000 FT candidats.

En première approximation, on peut considérer que la fixation des FP induit à terme une déplétion locale des nucléosomes sur les *enhancers*, et crée ainsi un état permissif pour le recrutement des machineries de modifications épigénétiques, permettant alors l'activation des *enhancers* et *in fine* la transcription des gènes. La fixation des FP est en effet corrélée avec le déplacement local des histones H1 *linkers*, favorisant la décompaction chromatinienne (Iwafuchi-Doi M, *et al.* 2016). Les FP permettent ensuite le recrutement local de co-facteurs remodelant de la chromatine comme le complexe SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) permettant l'éviction ou le déplacement des nucléosomes (Engelen E, *et al.* 2011 ; Takaku M, *et al.* 2016 ; King H W et Klose R J, 2017). Ils sont également impliqués dans la régulation d'autres mécanismes épigénétiques, comme la déméthylation active de l'ADN en recrutant des facteurs comme TET2 (Zhang Y, *et al.* 2016 ; Sardina J L, *et al.* 2018 ; Donaghey J, *et al.* 2018). De façon intéressante, des expériences suggèrent que la présence du FP n'est pas forcément requise pour le maintien de l'activité de l'*enhancer* une fois celle-ci initiée. Ainsi, la déméthylation des *enhancers* spécifiques du lignage mélanotrope induite par la fixation du FP PAX7 se maintient sur le long terme même si l'expression de PAX7 est ensuite inhibée (Mayran A, *et al.* 2018). Cela suggère qu'il existe des mécanismes maintenant l'activité du répertoire d'*enhancers* indépendamment du FP.

Enfin, la fixation des FP permet également le marquage épigénétique des séquences régulatrices. Par exemple, le FP FOXA1 permet le recrutement des histones méthyltransférases

comme MLL3 (Jozwik K M, *et al.* 2016) induisant ainsi le dépôt *de novo* de la marque H3K4me1 sur les séquences cibles et donc leur reconnaissance par la cellule comme de nouveaux *enhancers*. Les FP participent également au recrutement d'histones acétyltransférases comme P300, permettant l'enrichissement local en histones acétylées et ainsi l'activation des *enhancers* (Espinosa J M et Emerson B M, 2001) et la cascade d'évènement conduisant *in fine* à l'initiation de la transcription des gènes (Hsu H-T, *et al.* 2015). Par exemple, nous avons vu dans le chapitre précédent qu'ER α est capable d'activer un répertoire d'*enhancers* dans ses tissus cibles en recrutant l'enzyme P300 notamment. Cependant ER α n'est pas un FP, la présence de nucléosomes sur ses sites de liaison inhibant sa fixation (He H H, *et al.* 2012). Dans les cellules de l'épithélium mammaire ou dans les hépatocytes, le recrutement d'ER α sur les *enhancers* est notamment permis par l'interaction avec le FP FOXA1. La délétion de FOXA1 dans ces cellules entraîne en effet une perte d'environ 75 % de la liaison d'ER α sur ses sites et une perte d'activité des *enhancers* concernés (Hurtado A, *et al.* 2011).

Les FP se fixent donc principalement sur un répertoire de futurs *enhancers* spécifiques d'un lignage donné (Lupien M, *et al.* 2008 ; Hurtado A, *et al.* 2011 ; Donaghey J, *et al.* 2018) soulignant encore le rôle prédominant des *enhancers* dans le processus de différenciation cellulaire. Toutefois, les FP n'activeraient pas nécessairement de façon directe les *enhancers* et il semblerait que leur fixation à la chromatine constitue en réalité la première étape d'un processus complexe impliquant de nombreux acteurs. Par exemple, PAX7, le FP essentiel à la différenciation des cellules mélanotropes hypophysaires, n'est pas suffisant seul pour induire l'activation du répertoire d'*enhancers* spécifiques et l'expression des gènes clés. Ces étapes requièrent, en effet, le recrutement additionnel du FT TBX19, un FT non pionnier (Budry L, *et al.* 2012 ; Mayran A, *et al.* 2018). Ainsi, l'invalidation de PAX7 comme de TBX19 dans les progéniteurs hypophysaires entraînent des anomalies importantes de la différenciation des cellules mélanotropes (Budry L, *et al.* 2012 ; Mayran A, *et al.* 2019).

Comme indiqué précédemment, peu de facteurs pionniers ont été caractérisés à ce jour malgré leur importance dans les processus de différenciation cellulaire. Ainsi, les mécanismes fondamentaux initiant l'expression des gènes marqueurs du lignage gonadotrope n'ont toujours pas été élucidés. Au cours de mes travaux de recherche, alors que je m'intéressais aux mécanismes de régulation de l'expression d'un des gènes marqueurs du lignage gonadotrope, le gène *Nr5a1*, j'ai découvert un nouvel *enhancer* de ce gène, activé pendant la différenciation précoce des cellules gonadotropes. La dissection des mécanismes moléculaires d'activation de

cet *enhancer* que j'ai entreprise lors de mon travail de thèse est une première étape pour l'identification du premier FP du lignage gonadotrope.

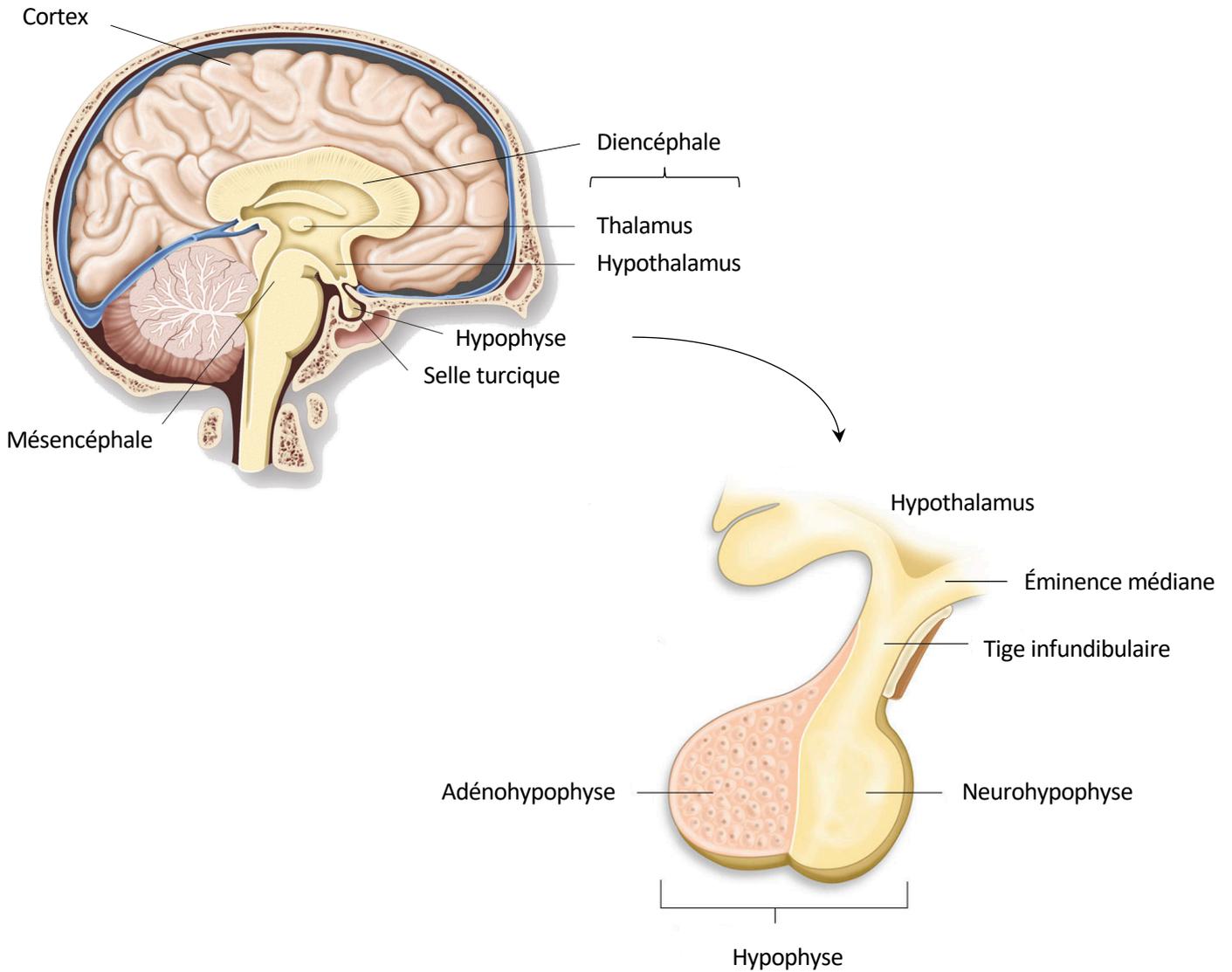


Figure 10. Organisation de l'hypophyse dans l'espèce humaine. L'hypophyse est une glande endocrine multi-hormonale située dans une cavité osseuse de l'os sphénoïde appelée selle turcique. Elle est localisée en dessous du cerveau et se rattache à l'hypothalamus. L'hypophyse est constituée de deux lobes : l'adénohypophyse (ou hypophyse glandulaire) et la neurohypophyse (ou hypophyse nerveuse). La neurohypophyse est directement rattachée à l'hypothalamus par l'intermédiaire de la tige infundibulaire qui se prolonge par l'éminence médiane au contact de l'hypothalamus. L'hypophyse et l'hypothalamus forment ainsi une unité anatomique et fonctionnelle : le complexe hypothalamo-hypophysaire.

2. Les cellules gonadotropes hypophysaires : actrices essentielles de la fonction de reproduction chez les mammifères

2.1 L'hypophyse : centre de contrôle hormonal de l'organisme

L'hypophyse, une glande endocrine apparue spécifiquement chez les vertébrés, produit plusieurs hormones importantes pour la régulation de fonctions essentielles de l'organisme comme la lactation, la croissance, la réponse au stress et également la reproduction. Elle est localisée dans la selle turcique, une dépression de l'os sphénoïde située à la base de la boîte crânienne (Figure 10). Sa position anatomique la place directement sous le système nerveux central, et plus précisément sous l'hypothalamus auquel elle est intimement associée à la fois d'un point de vue structural et d'un point de vue fonctionnel. En effet, la sécrétion des différentes hormones hypophysaires est sous le contrôle majeur de l'activité de neurones hypothalamiques. L'hypophyse constitue donc un relais primordial entre le système nerveux central et les organes cibles de ce contrôle nerveux. Des anomalies de développement de cette glande ont donc des conséquences pathologiques pléiotropes, souvent sévères. Dans une première section de ce manuscrit, je décrirai brièvement l'organisation anatomique et fonctionnelle de l'hypophyse.

2.2 Organisation anatomique et fonctionnelle de l'hypophyse

Chez les mammifères, l'hypophyse se compose de deux parties distinctes anatomiquement et fonctionnellement (Figure 10) : l'adénohypophyse (ou hypophyse glandulaire) et la neurohypophyse (ou hypophyse nerveuse, aussi appelée hypophyse postérieure).

2.2.1 La neurohypophyse ou hypophyse nerveuse

La neurohypophyse (ou *pars nervosa*) constitue le lobe nerveux de l'hypophyse. Ce lobe se forme au cours de la vie embryonnaire à partir d'une évagination du plancher du diencephale. Véritable prolongement de l'hypothalamus, ce lobe y est directement relié par la tige infundibulaire qui se prolonge par l'éminence médiane au contact direct de l'hypothalamus. La neurohypophyse renferme les terminaisons nerveuses de corps cellulaires de neurones localisés dans les noyaux supra-optiques et para-ventriculaires de l'hypothalamus. Elle libère ainsi deux neuro-hormones hypothalamiques (également appelées hormones neuro-hypophysaires) dans la circulation sanguine (Figure 11) :

- La vasopressine (ou hormone anti-diurétique, ADH : *Antidiuretic Hormone*), qui agit sur les reins et participe à la régulation de l'équilibre hydrique.

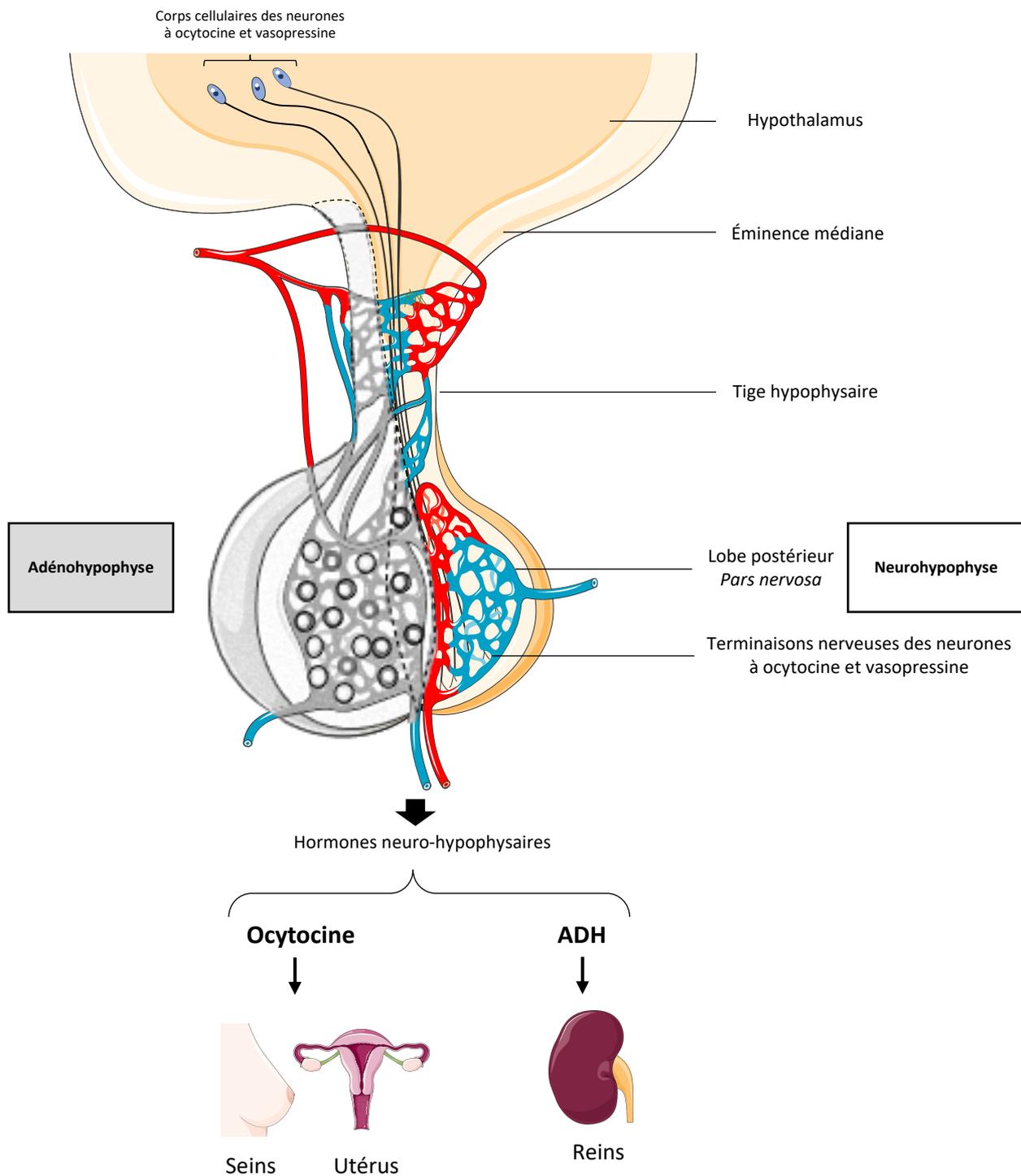


Figure 11. La neurohypophyse. La neurohypophyse ou *pars nervosa*, également appelée hypophyse postérieure, correspond au lobe nerveux de l'hypophyse. Elle est composée principalement de terminaisons nerveuses issues de neurones dont les corps cellulaires sont localisés dans les noyaux supra-optiques et para-ventriculaires de l'hypothalamus. Ces neurones sécrètent deux neuro-hormones hypothalamiques libérées au niveau de la neurohypophyse : l'ocytocine, qui agit sur la sécrétion de lait par la glande mammaire, ainsi que sur l'utérus lors de la parturition, et l'hormone anti-diurétique (ADH) qui agit sur les reins et participe à la régulation de l'équilibre hydrique.

- L'ocytocine, qui agit notamment sur l'utérus lors de la parturition ainsi que sur les glandes mammaires pour déclencher l'éjection du lait.

La neurohypophyse renferme aussi de nombreuses cellules de type glial appelées pituicytes. Ces cellules auraient un rôle dans la libération des hormones par les terminaisons axonales auxquelles elles sont étroitement associées (Hatton G I, 1988).

2.2.2 L'adénohypophyse ou hypophyse glandulaire

L'adénohypophyse (également appelée hypophyse glandulaire) correspond quant à elle au lobe endocrine de l'hypophyse. Sa nature histologique est différente de celle de la neurohypophyse puisqu'elle est issue de l'ectoderme oral embryonnaire. Chez les mammifères, et en particulier chez les rongeurs, elle est subdivisée en trois régions distinctes (Figure 12) :

1) Le lobe antérieur (ou *pars distalis*) correspondant à l'antéhypophyse). Il contient les cinq types cellulaires endocrines qui assurent les fonctions principales de la glande :

- Les cellules lactotropes sécrétant la prolactine (PRL) qui a un effet mammatrope (croissance et différenciation des glandes mammaires) et lactogénique (stimulation de la synthèse lactée) lors de la gestation.
- Les cellules somatotropes sécrétant l'hormone de croissance (GH : *Growth Hormone*) qui permet la croissance des tissus et des os.
- Les cellules corticotropes sécrétant l'hormone corticotrope (ACTH : *Adrenocorticotropic Hormone*) qui stimule la production de corticostéroïdes par le cortex des glandes surrénales.
- Les cellules thyrotropes sécrétant la thyrostimuline (TSH : *Thyroid Stimulating Hormone*) qui stimule la production d'hormones thyroïdiennes par la thyroïde.
- Enfin, les cellules gonadotropes qui sont les seules cellules endocrines de l'hypophyse à sécréter deux hormones : l'hormone lutéinisante (LH : *Luteinizing Hormone*) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH : *Follicle-Stimulating Hormone*). Ces hormones vont agir sur les gonades (ovaires ou testicules) afin de réguler la production de stéroïdes gonadiques (stéroïdogénèse) et de gamètes sexuels (gamétogénèse), essentielles à la fonction de reproduction.

2) Le lobe intermédiaire (ou *pars intermedia*). Chez les rongeurs, il contient une seule population de cellules endocrines : les cellules mélanotropes. Ces cellules sécrètent l'hormone mélanotrope (MSH : *Melanocyte-Stimulating Hormone*) qui stimule la synthèse de la mélanine

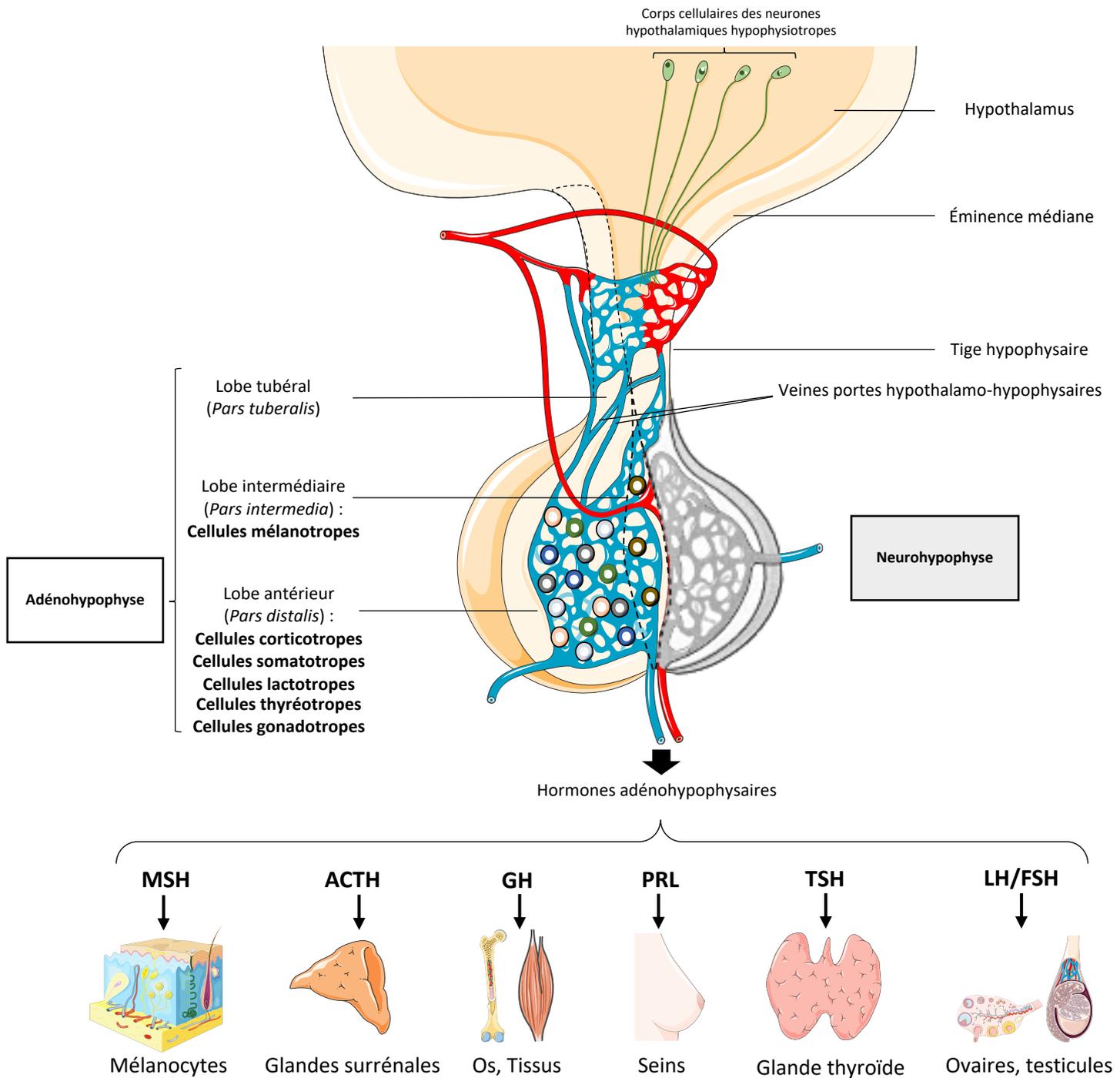


Figure 12. L'adénohypophyse. L'adénohypophyse correspond à la partie endocrine de l'hypophyse. Elle est subdivisée en trois régions : le lobe antérieur (ou *pars distalis*), le lobe intermédiaire (ou *pars intermedia*) et le lobe tubéral (ou *pars tuberalis*). L'adénohypophyse renferme six types cellulaires endocrines différents qui, en réponse aux neuro-hormones hypothalamiques qui atteignent l'hypophyse *via* le système sanguin porte hypothalamo-hypophysaire, sécrètent différentes hormones adénohypophysaires. Ces types cellulaires sont les cellules mélanotropes (produisant la MSH), les cellules corticotropes (produisant l'ACTH), les cellules somatotropes (produisant la GH), les cellules lactotropes (produisant la PRL), les cellules thyrotropes (produisant la TSH) et les cellules gonadotropes (produisant LH et FSH). Ces hormones sont libérées dans la circulation sanguine et agiront sur leurs différents tissus cibles répartis dans tout l'organisme.

par les mélanocytes. Ce lobe intermédiaire n'est pas retrouvé chez tous les vertébrés. Par exemple, chez l'humain, seule une structure résiduelle dépourvue de cellules mélanotropes est présente à l'âge adulte (Rasmussen A T, 1928).

3) Le lobe tubéral (ou *pars tuberalis*) qui contient quelques cellules mélanotropes. Cette région contient également des cellules à TSH particulières, qui, contrairement aux cellules thyrotropes de la *pars distalis*, sont insensibles au neuropeptide TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*) ou aux hormones thyroïdiennes, mais possèdent des récepteurs de la mélatonine. La libération de TSH par la *pars tuberalis*, sous contrôle de la mélatonine, est impliquée dans la régulation circadienne et saisonnière de la fonction de reproduction (pour revue : Chen J, *et al.* 2020).

Par ailleurs, on trouve également une population de cellules non endocrines réparties dans l'ensemble de l'adénohypophyse : les cellules folliculo-stellaires. Elles sont organisées en réseau interconnecté et sont en contact étroit avec les populations cellulaires endocrines de l'adénohypophyse. Ces cellules sécrètent des facteurs paracrines qui modulent l'activité des cellules endocrines (Baes M, *et al.* 1987 ; Allaerts W, *et al.* 1994). Elles pourraient aussi jouer un rôle immunologique (Lohrer P, *et al.* 2000) voire même constituer des cellules souches (pour revue : Devnath S et Inoue K, 2008).

Enfin, on trouve également une population de véritables cellules souches dans l'hypophyse adulte. Le rôle de ces cellules est encore mal compris, mais elles pourraient participer à l'homéostasie cellulaire de l'hypophyse au cours de la vie (pour revue : Russell J P, *et al.* 2018).

L'activité des cellules endocrines adénohypophysaires est sous le contrôle majeur des neuro-hormones sécrétées par les neurones hypothalamiques. Ces neurosécrétions sont libérées dans le plexus capillaire situé au niveau de l'éminence médiane et parviennent jusqu'à l'adénohypophyse par le réseau vasculaire porte hypothalamo-hypophysaire. La fonction endocrine de l'hypophyse est également finement contrôlée par de nombreux facteurs paracrines et endocrines émanant notamment mais pas exclusivement des gonades.

Dans la suite de mon manuscrit, je m'intéresserai uniquement à la régulation de la fonction gonadotrope hypophysaire, essentielle à la reproduction. Après de très succincts rappels sur la

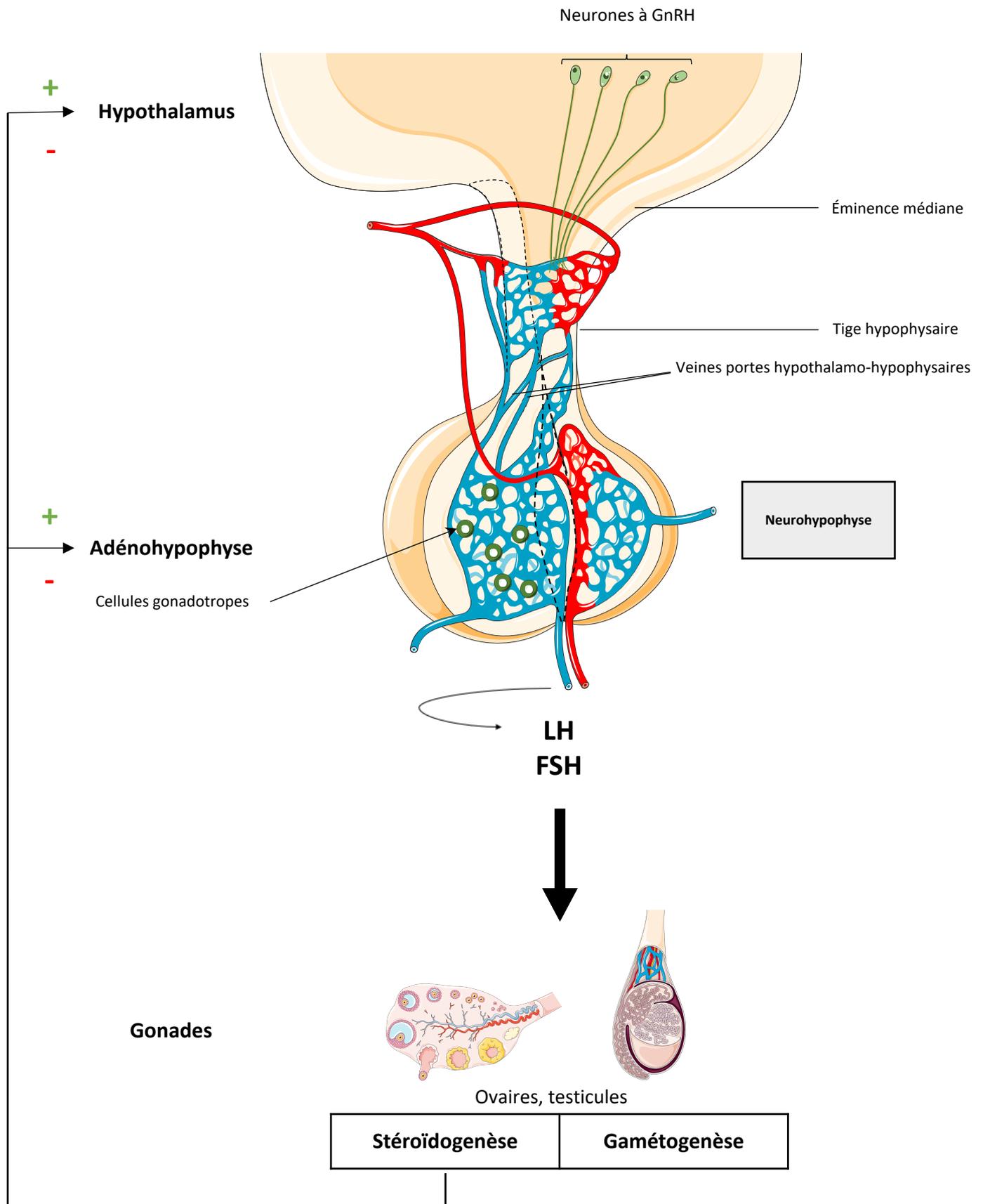


Figure 13. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. La fonction de reproduction est sous la dépendance de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. La neuro-hormone hypothalamique GnRH est sécrétée de façon pulsatile dans le système sanguin porte hypothalamo-hypophysaire. Elle agit *via* son récepteur présent spécifiquement à la surface des cellules gonadotropes de l'adénohypophyse pour stimuler la synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes, LH et FSH, qui seront libérées dans la circulation sanguine générale. Ces hormones vont agir à leur tour sur les gonades, ovaires ou testicules, afin de réguler leur stéroïdogénèse et leur gamétogénèse. Les stéroïdes gonadiques produits par les gonades vont exercer un rétro-contrôle négatif et/ou positif sur l'activité du complexe hypothalamo-hypophysaire permettant de contrôler finement l'activité de reproduction.

régulation exercée par l'hypophyse sur le fonctionnement des gonades, je détaillerai les mécanismes moléculaires à l'origine de l'émergence du lignage gonadotrope dans l'hypophyse embryonnaire, sur lesquels ont été centrés mes travaux de recherche.

2.3 La fonction de reproduction chez les mammifères

La reproduction sexuée repose sur la formation d'un embryon à partir de la fusion de deux gamètes, mâle (spermatozoïde) et femelle (ovocyte), produits par les gonades (testicules et ovaires, respectivement) lors de la gamétogenèse. Chez les vertébrés, l'activité gonadique est sous le contrôle des hormones gonadotropes LH et FSH issues du complexe hypothalamo-hypophysaire, mais également des hormones produites par les gonades elles-mêmes. Les hormones stéroïdiennes notamment, outre leur rôle local dans le fonctionnement des gonades, exercent un rétro-contrôle ajustant l'activité du complexe hypothalamo-hypophysaire. De ce fait, la mise en place et le maintien de la fonction de reproduction dépend de l'activité hormonale de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, que je vais présenter brièvement (Figure 13).

2.3.1 Régulations hormonales au sein de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

La fonction gonadotrope hypophysaire est sous le contrôle central d'une petite population de neurones hypothalamiques appelés neurones à GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*). Ces neurones sont peu nombreux (environ 1000 chez les rongeurs) et leurs corps cellulaires sont localisés de façon relativement dispersée dans l'hypothalamus. Toutefois, l'essentiel des neurones GnRH se retrouve dans deux régions de l'hypothalamus, l'hypothalamus antérieur et l'hypothalamus médio-basal avec des différences de répartition entre ces deux régions, selon les espèces. Chez les rongeurs, les neurones à GnRH sont majoritairement localisés dans l'aire pré-optique d'où ils projettent leurs terminaisons nerveuses vers l'éminence médiane (Wray S, *et al.* 1989). Ils synthétisent et sécrètent de façon pulsatile la neuro-hormone hypothalamique GnRH dans le système vasculaire porte hypothalamo-hypophysaire (Merchenthaler I, *et al.* 1989). La GnRH agit sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse qui sont les seules dans l'hypophyse à exprimer à leur surface le récepteur de la GnRH, le GnRHR (*Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor*). L'activation de ce récepteur par son ligand entraîne la synthèse et la sécrétion pulsatile des deux hormones gonadotropes, ou gonadotropines : LH et FSH (Counis R, *et al.* 2005).

La nature pulsatile de la sécrétion de la GnRH est un élément essentiel pour la sécrétion des hormones gonadotropes. En effet, les expériences princeps de Belchetz en 1978 ont permis de montrer que pour rétablir la fonction sécrétoire des cellules gonadotropes chez des macaques *Rhésus* privés de GnRH par lésion de l'hypothalamus, il est nécessaire d'administrer de la GnRH exogène de façon pulsatile et non continue (Belchetz P E, *et al.* 1978). L'importance du caractère pulsatile de la sécrétion de la GnRH est soulignée par la mise en place d'une désensibilisation de la réponse gonadotrope hypophysaire, *in vitro* comme *in vivo*, en réponse à une stimulation continue (Weiss J, *et al.* 1990 ; Liu F, *et al.* 2003). La fréquence de la pulsativité de la GnRH serait même un facteur contribuant à la régulation différentielle de la sécrétion des hormones gonadotropes. Ainsi, chez le rongeur, une pulsativité élevée (un pulse toutes les trente minutes) favorise la synthèse et la sécrétion de la LH, tandis qu'une pulsativité faible (un pulse toutes les deux heures) favorise la synthèse et la sécrétion de la FSH (Dalkin A C, *et al.* 1989). Ceci s'explique, au moins en partie, par l'activation par la GnRH d'une combinatoire complexe de réseaux de signalisation dans les cellules gonadotropes. Cette question a fait l'objet de nombreuses investigations qui dépassent cependant le cadre de ce manuscrit (pour revue : Coss D, 2017).

La régulation de la sécrétion des hormones gonadotropes au cours de la vie reproductive est un processus finement contrôlé. A la puberté, l'augmentation des concentrations de LH et FSH suite à l'activation des neurones à GnRH déclenche la puberté se caractérisant par une augmentation des stéroïdes gonadiques et par la production de gamètes par les gonades. Chez le mâle, la FSH agit sur les cellules de Sertoli et stimule la spermatogenèse, tandis que la LH stimule la production d'androgènes par les cellules de Leydig. Une fois la puberté initiée chez le mâle, la fonction gonadotrope est globalement régulière, assurant une production spermatique continue tout au long de l'année (ou durant la saison de reproduction chez les espèces saisonnières). Chez la femelle, au contraire, le fonctionnement de l'ovaire, en termes de production de gamètes et d'hormones stéroïdes, est cyclique. Ce fonctionnement cyclique s'observe dans l'ensemble de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique et dans les organes cibles des stéroïdes ovariens. Ceci définit le cycle sexuel, cycle œstrien chez la plupart des espèces de mammifères ou cycle menstruel chez les primates. Chez la femelle, les deux hormones gonadotropes sont nécessaires à la stéroïdogenèse : la LH entraîne la synthèse d'androgènes dans les cellules de la thèque, qui seront ensuite transformés en œstrogènes dans les cellules de la granulosa en réponse à la FSH. Les hormones gonadotropes interviennent également de façon différentielle et successive sur la croissance folliculaire : la FSH stimule le recrutement et la croissance folliculaire tandis que la LH contrôle la croissance terminale des

follicules. Ces deux hormones sont ainsi nécessaires directement ou indirectement à l'ovulation. Les cellules gonadotropes assurent donc une fonction centrale dans la régulation de la reproduction chez le mâle et la femelle, et il est essentiel de comprendre les mécanismes concourant à leur différenciation et à leur fonction. Ceci nécessite de définir précisément ce qu'est une cellule gonadotrope hypophysaire.

2.3.2 Qu'est-ce qu'une cellule gonadotrope hypophysaire ?

La population de cellules gonadotropes hypophysaires est une petite population au sein de l'hypophyse puisque ces cellules ne représentent que 10 à 15 % des cellules endocrines de l'adénohypophyse. Des études suggèrent que cette proportion pourrait varier au cours de la vie de l'individu, notamment chez la femelle en fonction du cycle œstrien (Smith P F, *et al.* 1984 ; Childs G V, *et al.* 1992). Chez la souris, les premières cellules gonadotropes apparaissent à 13,5 jours post-conception (jpc) lors du développement embryonnaire, regroupées dans la partie ventrale de l'adénohypophyse (Le Tissier P R, *et al.* 2012). Elles seront, par la suite, retrouvées dispersées dans le parenchyme de la *pars distalis* après la naissance sous la forme de deux populations, l'une dense et en position dorsale, et l'autre organisée en travées dans la région ventrale qui établissent des contacts étroits en particulier avec les cellules corticotropes et la microvascularisation antéhypophysaire (Budry L, *et al.* 2011 ; Alim Z, *et al.* 2012).

Les cellules gonadotropes sont caractérisées par l'expression d'un répertoire spécifique de gènes qui leur confère leur rôle essentiel dans la fonction de reproduction. Elles expriment notamment le gène du récepteur de la GnRH (*Gnrhr*). Elles expriment également les gènes permettant la synthèse des hormones gonadotropes qui sont des hormones complexes, appartenant à la famille des hormones glycoprotéiques et constituées chacune de deux sous-unité α et β , associées de façon non covalente. La sous-unité α (ou α GSU pour *α -Glycoprotein Hormone Subunit*) est commune à l'ensemble des hormones glycoprotéique, LH, FSH, TSH et CG (*Chorionic Gonadotropin*). La sous-unité β confère la spécificité à l'hormone. Les cellules gonadotropes expriment ainsi les gènes codant les sous-unités spécifiques, *Lhb* et *Fshb*, ainsi que le gène *Cga* codant l' α GSU (ce gène étant aussi exprimé dans le lignage thyroïdote). Une altération de l'expression de l'un de ces gènes essentiels pour la fonction gonadotrope entraîne ainsi des défauts de la fonction de reproduction caractérisés par un hypogonadisme hypogonadotrope, associé à une hypofertilité ou une stérilité de l'individu (Layman L C, 2000 ; Lofrano-Porto A, *et al.* 2007 ; Kim H-G, *et al.* 2010).

On peut donc définir, en première intention, la cellule gonadotrope comme une cellule 1) hypophysaire, 2) qui exprime le récepteur de la GnRH et 3) qui synthétise et secrète les gonadotropines LH et FSH en réponse à une stimulation par la GnRH. Cette définition a été à la base des études des mécanismes de la différenciation du lignage gonadotrope. Un gène était considéré comme impliqué dans cette différenciation quand ses mutations interfèrent avec l'expression des gènes marqueurs *Gnrhr*, *Cga*, *Lhb* ou *Fshb* dans les cellules hypophysaires au cours du développement hypophysaire. Pour la suite de cet exposé, nous nous intéresserons donc aux mécanismes moléculaires, et essentiellement aux FT, impliqués dans la différenciation de ces cellules. Cette différenciation se déroulant de façon interdépendante avec l'organogenèse hypophysaire, je commencerai le prochain chapitre par la description des mécanismes impliqués dans cette organogenèse.

3. Organogenèse de l'hypophyse et différenciation des cellules gonadotropes hypophysaires

La différenciation du lignage gonadotrope, et plus largement de celle de l'ensemble des lignages de l'adénohypophyse, se déroule de façon concomitante avec l'organogenèse de l'hypophyse. Les différents types cellulaires endocrines de l'hypophyse se différencient tous à partir d'une même population de cellules issues de l'ectoderme oral. Les lignages hypophysaires émergent ensuite de façon régionalisée, et successivement au cours du développement hypophysaire, sous l'influence des différentes combinaisons de facteurs paracrines (les gradients morphogénétiques, voir plus loin §3.1.2) qui permettent l'expression régionalisée de FT (Simmons D M, *et al.* 1990).

L'ontogenèse hypophysaire s'établit en deux grandes étapes : une première étape d'organogenèse hypophysaire précoce, qui correspond à la mise en place des territoires tissulaires de la future hypophyse puis à la formation de l'hypophyse primordiale (appelée poche de Rathke). Cette première étape est suivie par une étape de différenciation terminale de l'ensemble des cellules endocrines de l'adénohypophyse. Comme nous le verrons par la suite, la première étape est largement sous la dépendance des tissus environnants et permet de mettre en place, au sein du tissu hypophysaire, des territoires d'expression de FT. Ces FT interviennent alors dans la seconde étape de différenciation des lignages endocrines qui s'opère de façon autonome par rapport aux tissus environnants.

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'organogenèse de l'adénohypophyse et de la différenciation du lignage gonadotrope ont été étudiés dans différents organismes modèles comme le poisson-zèbre, l'amphibien ou le poulet (Osumi-Yamashita N, *et al.* 1994 ; Rubenstein J L, *et al.* 1998 ; Kouki T, *et al.* 2001 ; Kawamura K, *et al.* 2002 ; Pogoda H-M et Hammerschmidt M, 2007), et ils apparaissent assez bien conservés entre les différentes espèces de vertébrés. Cependant, les processus moléculaires que je vais vous présenter par la suite ont été majoritairement élucidés chez la souris.

3.1 Différenciation embryonnaire de l'hypophyse chez la souris

3.1.1 Organogenèse hypophysaire embryonnaire précoce

L'adénohypophyse est issue d'une placode crâniale : la placode hypophysaire, qui provient d'un épaissement de l'ectoderme oral. Une placode est un groupe de cellule souches, capable

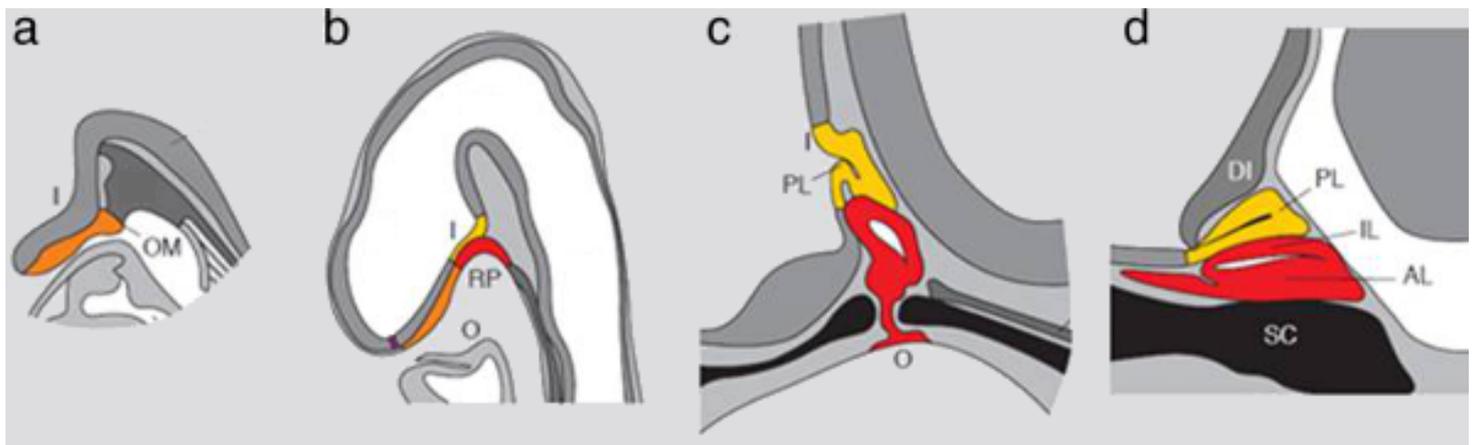


Figure 14. Développement embryonnaire de l'hypophyse murine. a. L'adénohypophyse dérive du tissu de l'ectoderme oral (en orange). b. Dans cet ectoderme oral se précise une région particulière appelée placode hypophysaire qui sera à l'origine de l'adénohypophyse. Le développement puis l'invagination de cette placode conduit à la formation d'une structure hypophysaire primitive appelée poche de Rathke (rouge). Cette poche de Rathke entrera en contact avec une partie de l'ectoderme neural appelé infundibulum (jaune), qui sera à l'origine de l'hypophyse postérieure. c. La poche de Rathke s'individualisera progressivement de l'ectoderme oral aux alentours de 12 jpc. Au même moment, l'infundibulum s'évagine pour former l'hypophyse postérieure. d. La glande hypophysaire définitive, comprenant l'adénohypophyse et l'hypophyse postérieure, ne sera mise en place qu'aux alentours de 17 jpc, lorsque les différents types cellulaires endocrines se seront également différenciés.

Abréviations : **AL**, lobe antérieur; **DI**, diencéphale; **I**, infundibulum; **IL**, lobe intermédiaire; **O**, cavité orale; **OM**, ectoderme oral; **PL**, lobe postérieur; **RP**, poche de Rathke; **SC**, cartilage de l'os sphénoïde. D'après Sheng H Z et Westphal H, 1999.

de prolifération, de mouvements morphogénétiques et de différenciation. Les placodes crânielles dites neurogéniques sont impliquées dans la mise en place de différentes populations de cellules, notamment de neurones (de l'œil, du bulbe olfactif...) et, assez étrangement, des cellules non neuronales de l'adénohypophyse. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la placode hypophysaire est encore assez rudimentaire, cependant quelques FT, comme ceux issus des gènes de la famille des Pitx, Six et Otx, semblent y jouer un rôle important (pour revue : Schlosser G, 2006). Sans en exposer trop précisément les détails mécanistiques, on peut tirer deux grandes idées de l'étude des facteurs impliqués dans la formation des placodes en général et de la placode hypophysaire en particulier : 1) L'adénohypophyse étant issue d'une placode neurogénique, il n'est pas surprenant que sa différenciation comme celle de ses lignages cellulaires fassent intervenir des gènes plus classiquement considérés comme « gènes neuronaux », tels que *Isl1*, *Lhx3* (*LIM Homeobox 3*) ou *Neurod1/4* (*Neuronal Differentiation 1/4*) 2) De façon intéressante, les gènes impliqués dans la formation des placodes, qui s'expriment très tôt dans les tissus précurseurs de ces placodes, jouent aussi un rôle dans les étapes ultérieures de différenciation de l'hypophyse et des lignages endocrines. L'expression de certains de ces facteurs (comme PITX1/2, *Paired Like Homeodomain 1/2*, par exemple) peut même rester nécessaire pour le fonctionnement des cellules gonadotropes à l'âge adulte.

La placode hypophysaire, issue de l'ectoderme oral, va s'invaginer et former une première structure, la poche de Rathke (Dasen J S et Rosenfeld M G, 2001). Ceci a lieu très tôt au cours de l'embryogenèse, entre 8,5 et 9,5 jpc chez la souris. A environ 10,5 jpc, la poche de Rathke entre en contact avec l'infundibulum, une évagination de l'ectoderme neural à l'origine de l'éminence médiane, la tige infundibulaire et la neurohypophyse. La poche de Rathke n'est considérée achevée d'un point de vue anatomique qu'à partir de 12,5 jpc, lorsqu'elle s'individualise de l'ectoderme oral pour former la première ébauche d'adénohypophyse (Kusakabe M, *et al.* 1984 ; Rizzoti K et Lovell-Badge R, 2005). Cette individualisation est suivie d'une forte prolifération cellulaire permettant de mettre en place les différentes populations cellulaires de l'hypophyse (Figure 14).

La formation de la poche de Rathke est sous la dépendance des tissus adjacents qui secrètent un ensemble de facteurs paracrines, les morphogènes.

3.1.2 Gradients morphogénétiques et facteurs de transcription associés

L'invagination de la poche de Rathke puis le développement de l'adénohypophyse sont contrôlés par des gradients morphogénétiques, mis en place transitoirement, qui induisent

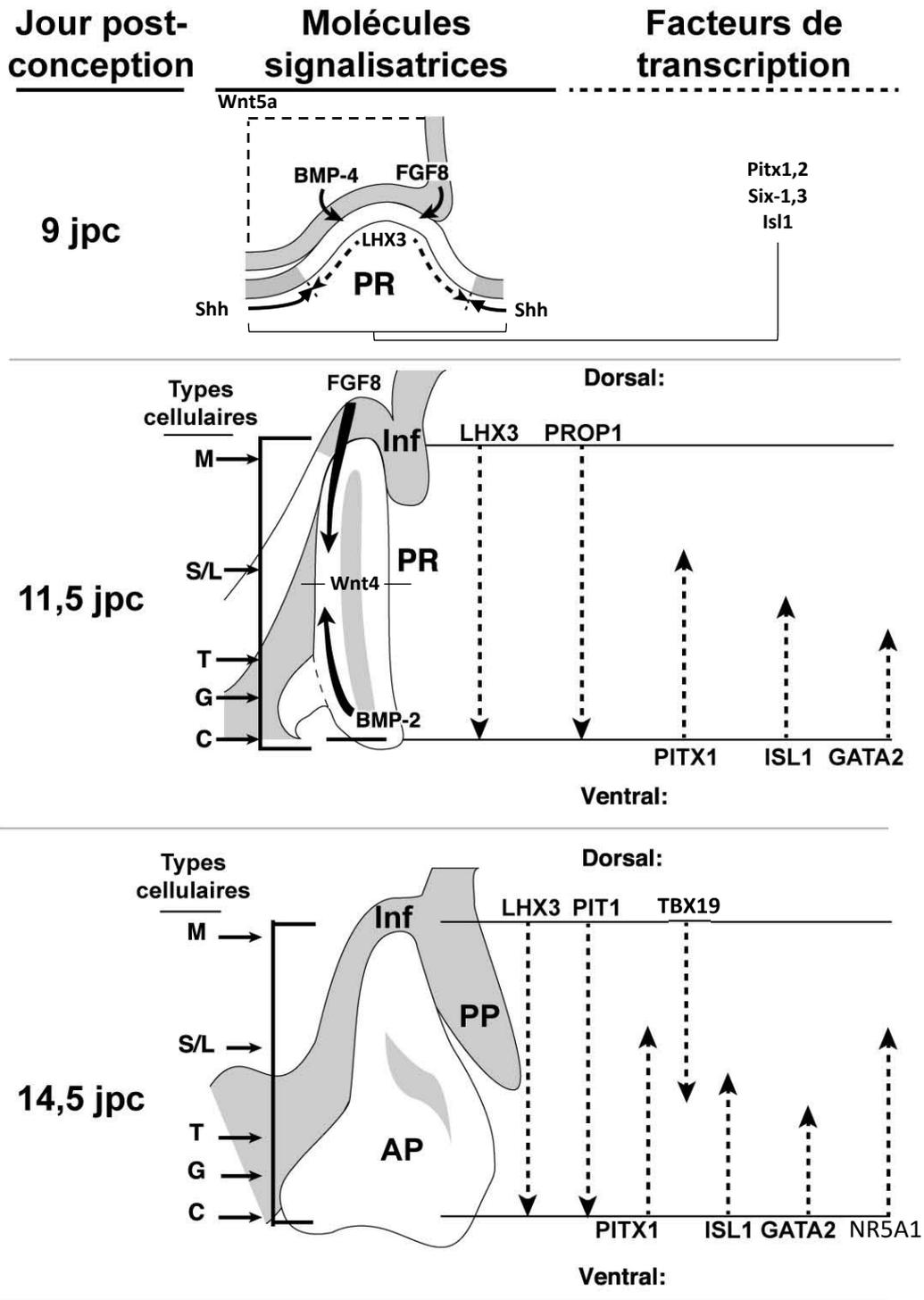


Figure 15. Gradients morphogénétiques de molécules signalisatrices et expression des facteurs de transcription au sein de l'hypophyse chez le rongeur. L'initiation de l'organogenèse hypophysaire implique la mise en place de gradients de facteurs morphogènes dès 9 jpc. Ces gradients permettent d'initier progressivement l'expression de facteurs de transcription jusqu'à 11,5 jpc, qui s'exprimeront ensuite de façon autonome pour définir les différents lignages hypophysaires. Ce schéma, issu de la publication de Scully K M et Rosenfeld M G, 2002, est très simplifié et ne présente que certains des acteurs identifiés qui ont été impliqués dans le processus d'organogenèse hypophysaire.

Abréviations : PR, poche de Rathke ; Inf, Infundibulum ; PP, hypophyse postérieure ; AP, hypophyse antérieure ; M, mélanotropes ; S/L, Somatotropes/Lactotropes ; T, Thyroïdotropes ; G, Gonadotropes ; C, corticotropes.

l'expression de FT au sein de l'hypophyse primordiale (Figure 15). Les gradients morphogénétiques peuvent être définis comme étant des gradients de concentration de molécules de signalisation paracrine diffusant au travers d'un tissu depuis leur source d'émission. La combinaison de plusieurs de ces gradients permet de définir des territoires différents dans le tissu cible se caractérisant par leur régionalisation moléculaire. Les molécules de signalisation qui composent ces gradients induisent alors, dans les territoires tissulaires qu'elles traversent, l'expression de combinaisons spécifiques de FT qui, à leur tour, induiront *in fine* la différenciation des cellules qui les expriment.

Le fait que le développement précoce de l'hypophyse soit strictement sous le contrôle de gradients morphogénétiques émis par les tissus adjacents a été mis en évidence par des expériences de cultures *in vitro* d'hypophyse embryonnaire. Ces expériences ont montré que la différenciation *in vitro* de l'adénohypophyse, et notamment l'initiation de son invagination, requiert sa co-culture avec l'infundibulum du diencéphale ventral, suggérant que ce dernier sécrète des facteurs paracrines stimulant le développement adénohypophysaire (Gleiberman A S, *et al.* 1999). Il a ensuite été montré que l'infundibulum sécrète, en effet, le facteur FGF8 (*Fibroblast Growth Factor 8*) et qu'un gradient dorso-ventral de FGF8 est essentiel à la mise en place des étapes précoces de l'organogenèse de l'adénohypophyse. Ce gradient de FGF8 est complété par un ensemble d'autres gradients morphogénétiques et notamment par un gradient de BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*). BMP4 est aussi sécrété de façon dorso-ventrale par l'infundibulum jusqu'à 10,5 jpc puis ce gradient est remplacé par un gradient ventro-dorsal de BMP2, exprimé directement cette fois-ci par le tissu hypophysaire en différenciation. En plus de ces gradients dorso-ventraux, un gradient latéral de SHH se met en place depuis l'ectoderme oral adjacent (Treier M, *et al.* 1998 ; Ericson J, *et al.* 1998 ; Kelberman D, *et al.* 2009). L'utilisation d'un modèle de souris transgéniques exprimant un inhibiteur de la voie SHH dans l'ébauche hypophysaire a permis de montrer que cette signalisation est essentielle à la mise en place normale de la poche de Rathke et du gradient de BMP2, et que son inhibition perturbe fortement la régionalisation ventrale du tissu (Treier M, *et al.* 2001).

En plus de ces principales molécules de signalisation, des expériences d'hybridation *in situ* sur des hypophyses de souris en développement ont montré la participation probable de gradients de facteurs Wingless (WNT), inducteurs classiques de la voie β -caténine, avec notamment l'expression de WNT5a depuis le diencéphale ventral et de WNT4 depuis les tissus latéraux de la poche de Rathke. Ces facteurs morphogènes seraient impliqués notamment dans les

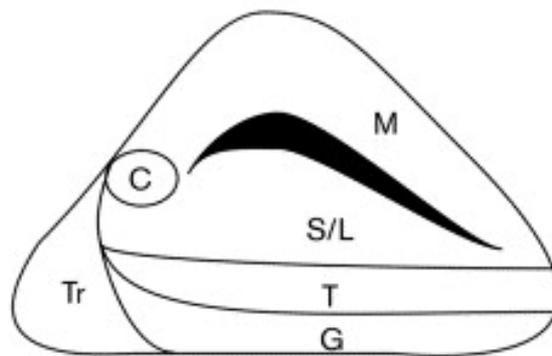


Figure 16. Distribution topographique des différents types cellulaires endocrines de l'adénohypophyse chez la souris. Au cours de l'ontogenèse hypophysaire, des facteurs de transcription se mettent en place selon des gradients au sein de l'hypophyse. Ces différents facteurs de transcription vont former des combinaisons, permettant l'émergence des différents lignages cellulaires endocrines de l'adénohypophyse de façon régionalisée : on trouve ainsi les cellules Mélanotropes (M), Corticotropes (C), Somatotropes et Lactotropes (S/L), Thyrotropes (T) et Gonadotropes (G). Au cours de l'ontogenèse hypophysaire se met également en place de façon transitoire une population de cellules thyrotropes fœtales appelées cellules Thyrotropes rostrales (Tr), qui disparaîtront peu avant la naissance. D'après Dasen J S et Rosenfeld M G, 1999.

processus de prolifération des cellules progénitrices, ainsi que dans la différenciation terminale des cellules endocrines de l'adénohypophyse (Russell J P, *et al.* 2021).

3.2 Facteurs de transcription et différenciation des lignages endocrines

Comme indiqué précédemment, les cellules endocrines hypophysaires se différencient de façon régionalisée au sein de l'hypophyse. Les progéniteurs de ces cellules sont, comme exposé plus haut, exposés à des combinaisons particulières de gradients morphogéniques et y répondent en modifiant leur répertoire transcriptomique et notamment en exprimant des combinaisons spécifiques de FT. Cette seconde phase de la différenciation hypophysaire devient ensuite indépendante des gradients morphogéniques, et nécessite même leur atténuation. Ainsi, le maintien artificiel des gradients, comme ceux de BMP2 ou BMP4 par exemple, interfère avec la différenciation terminale des lignages hypophysaires (Treier M, *et al.* 1998).

On connaît à présent assez bien l'effet des gradients sur l'expression des FT majeurs de la différenciation hypophysaire. L'expression hypophysaire du FT LHX3, par exemple, se régionalise en position dorsale sous l'effet de fortes concentrations de FGF8, tandis que le FT ISL1 s'exprime dans l'ensemble de l'hypophyse en développement avant 10,5/11 jpc sous l'influence de BMP4, avant de se localiser en position ventrale à partir de 12,5 jpc sous la stimulation de BMP2. BMP2 stimule également en position ventrale l'expression du facteur GATA2 qui est nécessaire à la différenciation des lignages thyroïdiques et gonadotropes. Le gradient latéral de SHH semble avoir un rôle plus complexe car il stimulerait à la fois l'expression de LHX3, nécessaire à la différenciation des lignages dorsaux, mais aussi celle de BMP2, nécessaire à la différenciation des lignages ventraux. La signalisation SHH participe donc plus largement à la différenciation de l'ensemble des lignages endocrines hypophysaires (Treier M, *et al.* 2001). De plus, WNT4 serait essentiel à l'expression des facteurs PIT-1 (*Pituitary Transcript Factor 1*) en combinatoire avec PROP1 (*Prophet of PIT-1*), qui entraîne ainsi la différenciation des lignages thyroïdiques, somatotropes et lactotropes. On passe donc de territoires tissulaires d'une même ébauche d'organe baignés par différents facteurs morphogènes à des territoires exprimant des FT différents.

A terme, les combinaisons de différents FT vont donc promouvoir la différenciation des lignages endocrines de façon régionalisée au sein de l'adénohypophyse (Figure 16). Ainsi, les facteurs comme LHX3, (en association avec d'autres facteurs comme TBX19) vont être à l'origine de la différenciation des lignages plutôt dorsaux (comme les lignages mélanotropes et

les corticotropes), des facteurs comme PIT-1 vont entraîner la différenciation des lignages « intermédiaires » thyroïdiques, somatotropes, et lactotropes tandis qu'une combinaison de différents facteurs comme FOXL2 (*Forkhead Box Protein L2*), GATA2 ou NR5A1 (*Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1*) entraîne la différenciation du lignage gonadotrope.

3.3 Les mécanismes moléculaires de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire

L'investigation des mécanismes moléculaires concourant à la différenciation du lignage gonadotrope a fait intervenir historiquement deux grandes catégories de modèles. Tout d'abord, des modèles génétiques de souris (mutants naturels, transgénèse additive, *knock-out*) ont permis d'étudier *in vivo* l'influence de certains acteurs sur la différenciation du lignage gonadotrope. Ces modèles ont permis d'établir que la différenciation des différents lignages endocrines hypophysaires est en partie interdépendante puisque des mécanismes activateurs de la différenciation de certains lignages sont souvent aussi des mécanismes inhibant la différenciation d'autres lignages. Ces modèles, aussi puissants soient-ils, ne permettent pas de disséquer finement les mécanismes moléculaires de la différenciation des lignages du fait de la complexité cellulaire de l'hypophyse (6 types endocrines associés avec des populations de cellules folliculo-stellaires, endothéliales...). Dans les années 1990, le laboratoire du Pr Pamela Mellon a développé une méthodologie d'oncogénèse ciblée qui lui a permis de générer un ensemble de lignées hypophysaires immortalisées caractéristiques d'un stade donné de la différenciation gonadotrope. Ces lignées constituent un modèle *in vitro* précieux pour l'étude de la spécification gonadotrope. Ces lignées, malgré leurs limites propres aux modèles cellulaires immortalisés, sont indispensables pour caractériser précisément les acteurs moléculaires nécessaires à l'expression des gènes clés du lignage gonadotrope. La majeure partie de mes travaux repose sur l'utilisation de ces lignées. Avant même d'aborder les mécanismes moléculaires de la spécification gonadotrope, je vais donc présenter ces modèles qui ont joué un rôle central dans mes travaux de doctorat.

3.3.1 Les modèles d'études *in vitro* de la différenciation du lignage gonadotrope

Ces différentes lignées cellulaires murines ont été obtenues par oncogénèse ciblée en dirigeant l'expression de l'antigène T du virus SV40 (*Simian Virus 40*) à l'aide de différentes séquences promotrices (Windle J J, *et al.* 1990 ; Alarid E T, *et al.* 1996). Ces promoteurs ont été choisis de façon à ce que l'oncogène s'exprime à des stades précis de la différenciation gonadotrope. Les tumeurs développées par ces souris ont ensuite été mises en culture, puis différents clones

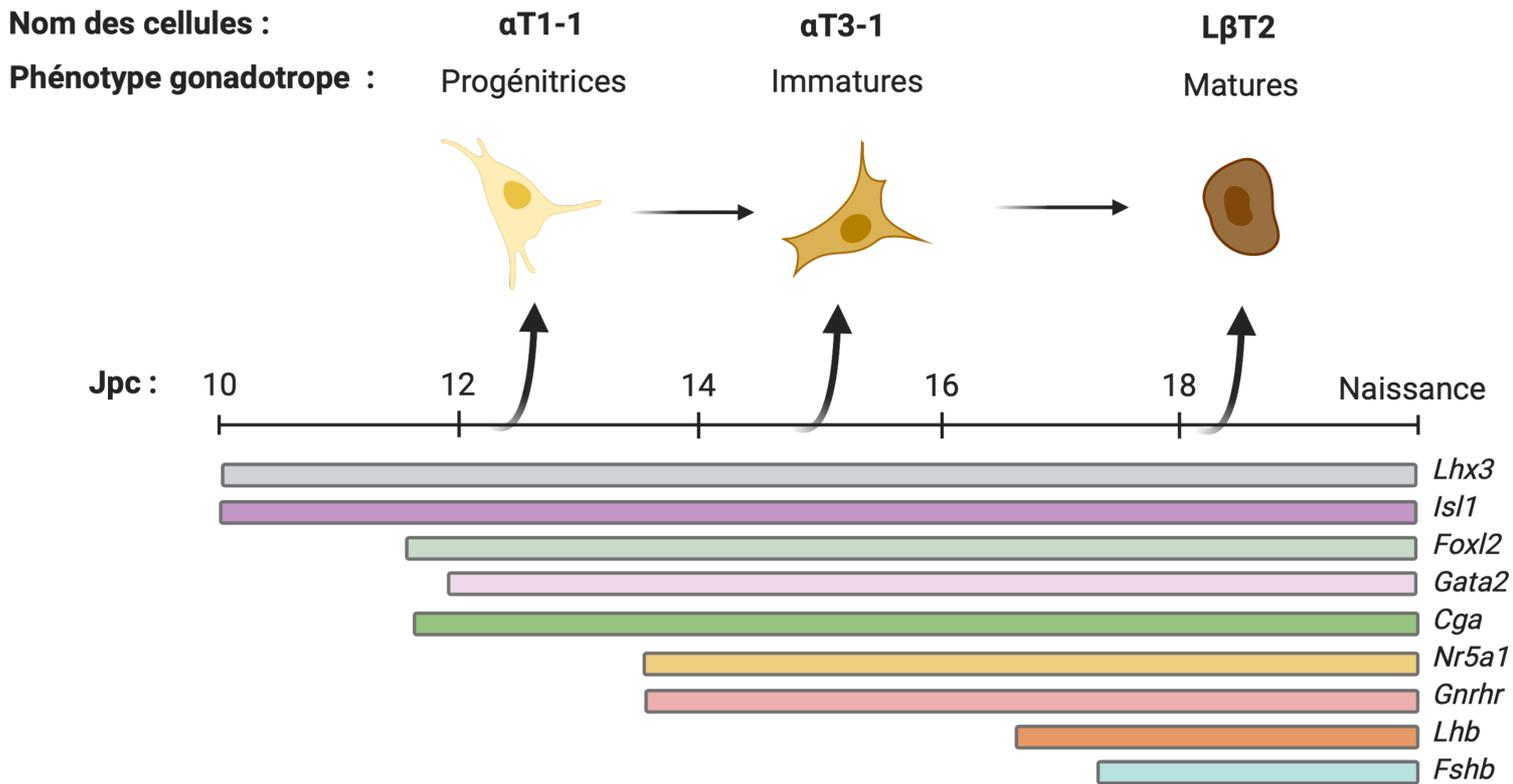


Figure 17. Caractérisation des trois lignées modèles de cellules gonadotropes murines immortalisées. Les études sur les cellules gonadotropes ont été grandement facilitées par le développement de lignées de cellules gonadotropes murines immortalisées, récapitulant la différenciation gonadotrope. On trouve ainsi les cellules dites progénitrices, α T1-1, dérivant de cellules entre 11,5 et 13,5 jpc, qui n'expriment que le gène marqueur *Cga*. Les cellules gonadotropes dites immatures, α T3-1, dérivent de cellules entre 13,5 et 16,5 jpc, puisqu'elles expriment certains gènes marqueurs de ce lignage comme *Cga*, *Nr5a1*, et *Gnhr*, mais n'expriment pas ceux de la différenciation terminale de ce lignage (*Lhb* et *Fshb*). Enfin, on trouve les cellules gonadotropes dites matures, L β T2, dérivées de cellules après 16,5 jpc, qui expriment l'ensemble des gènes marqueurs de ce lignage: *Cga*, *Gnhr*, *Nr5a1*, *Lhb* et *Fshb*. D'autres facteurs de transcription, impliqués dans la différenciation du lignage gonadotrope et plus largement dans l'ontogenèse hypophysaire, sont également exprimés dans l'ensemble de ces lignées cellulaires (comme *Lhx3*, *Isl1*, *Gata2*, *Foxl2*).

ont été isolés et caractérisés. Trois lignées, les lignées α T1-1, α T3-1 et L β T2, représentant trois stades différents de la spécification des cellules gonadotropes, ont été retenues et sont maintenant largement utilisées pour l'étude de la différenciation et du fonctionnement des cellules gonadotropes (Figure 17).

3.3.1.1 La lignée α T1-1 : des cellules « progénitrices »

La lignée cellulaire α T1-1 a été obtenue en plaçant l'expression de l'antigène T de SV40 sous le contrôle d'un fragment de 5,5 kbp du promoteur du gène *CGA*, ce qui permet l'expression précoce du transgène dans l'hypophyse. C'est la lignée modèle du stade le plus précoce du développement des cellules gonadotropes (Alarid E T, *et al.* 1996). Les caractéristiques moléculaires de cette lignée suggèrent que la cellule dont elle est issue a été immortalisée entre 11,5 et 13,5 jpc. Les cellules α T1-1 représentent donc des cellules dites « progénitrices ». En effet, elles expriment le gène *Cga*, codant la sous-unité α des hormones glycoprotéiques. En revanche, elles n'expriment aucun des marqueurs spécifiques de cellules gonadotropes différenciées comme les gènes *Gnrhr*, *Lhb*, ou *Fshb* (Windle J J, *et al.* 1990 ; Alarid E T, *et al.* 1996). On peut donc considérer, au vu de ce phénotype moléculaire, que les α T1-1 sont un modèle de progéniteurs des cellules gonadotropes et thyroïdotropes.

3.3.1.2 La lignée α T3-1 : des cellules gonadotropes « immatures »

La lignée cellulaire α T3-1 est la lignée modèle de cellules gonadotropes dites « immatures ». Elle a été obtenue en plaçant l'expression de l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle d'un fragment plus court, de 1,8 kbp, du promoteur du gène *CGA* qui permet l'expression plus tardive du transgène dans les cellules gonadotropes uniquement (Windle J J, *et al.* 1990). Les caractéristiques moléculaires de cette lignée suggèrent qu'elle représente des cellules gonadotropes entre 13,5 et 16,5 jpc car elle exprime certains des marqueurs précoces de la différenciation du lignage gonadotrope, comme le *Gnrhr*. En revanche, elles n'expriment pas les gènes marqueurs de la différenciation terminale, *Lhb* et *Fshb*. Cette lignée a été beaucoup utilisée pour caractériser les réseaux de signalisation activés par le récepteur de la GnRH (Stojilkovic S S, *et al.* 1994).

3.3.1.3 La lignée L β T2 : des cellules gonadotropes « matures »

La lignée cellulaire L β T2 est la lignée modèle de cellules gonadotropes dites « matures ». Elle a été obtenue en plaçant l'expression de l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle de la

séquence promotrice du gène *Lhb* de rat (Alarid E T, *et al.* 1996). Cette lignée de cellules gonadotropes exprime l'ensemble des gènes marqueurs du lignage gonadotrope, *Cga*, *Gnrhr*, *Lhb* et *Fshb* (Alarid E T, *et al.* 1996 ; Pernasetti F, *et al.* 2001). Les cellules L β T2 synthétisent et libèrent des hormones gonadotropes en réponse à la stimulation par la GnRH ou l'activine (Pernasetti F, *et al.* 2001), faisant de cette lignée un modèle classiquement utilisé pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la fonction gonadotrope.

3.3.2 Les facteurs de transcription de la différenciation gonadotrope

Parmi les nombreux FT qui participent à la différenciation du lignage gonadotrope, j'ai choisi de n'en présenter que quelques-uns qui permettent d'illustrer les grands mécanismes de la différenciation du lignage.

3.3.2.1 Gonadotrope ou thyrotrope ? Le rôle de la balance GATA2-PIT-1

Les processus moléculaires permettant d'orienter le destin cellulaire vers une différenciation gonadotrope ou thyrotrope prennent place aux alentours de 12,5 jpc chez la souris, dans la zone ventrale de l'hypophyse en différenciation qui est, à ce stade, baignée par de fortes concentrations de BMP2. Ces fortes concentrations en BMP2 permettent localement l'expression du facteur GATA2. En effet, un modèle de souris transgénique exprimant BMP2/4 de façon ectopique dans le parenchyme adénohypophysaire, en plaçant *Bmp2/4* sous le contrôle du promoteur de la *Cga*, met en évidence que dans ces conditions, GATA2 est exprimé hors de son territoire initial (Dasen J S, *et al.* 1999). Ce type de modèle, visant à modifier les territoires d'expression des gènes hypophysaires et mesurer ensuite les conséquences sur la différenciation des lignages a largement été utilisé, notamment par le laboratoire du Dr Rosenfeld et est expliqué en Figure 18. Quelles sont donc les conséquences d'une modification du territoire d'expression de GATA2 dans l'hypophyse en développement ? Afin de répondre à cette question, le même laboratoire a établi un autre modèle transgénique qui place GATA2 sous le contrôle du promoteur du gène *Pit-1* (*pPit-1-Gata2*). PIT-1 est un acteur majeur de la différenciation des lignages somatotropes, lactotropes et thyrotropes. Ces différents lignages ont été qualifiés à ce titre de lignages PIT-1-dépendants. Ainsi, la mutation de PIT-1 dans les souris Snell dwarf perturbe massivement et spécifiquement la différenciation de ces lignages (Camper S A, *et al.* 1990). *Pit-1* s'exprime dans un territoire intermédiaire, situé entre les régions ventrale et dorsale de l'adénohypophyse en différenciation. Forcer l'expression de

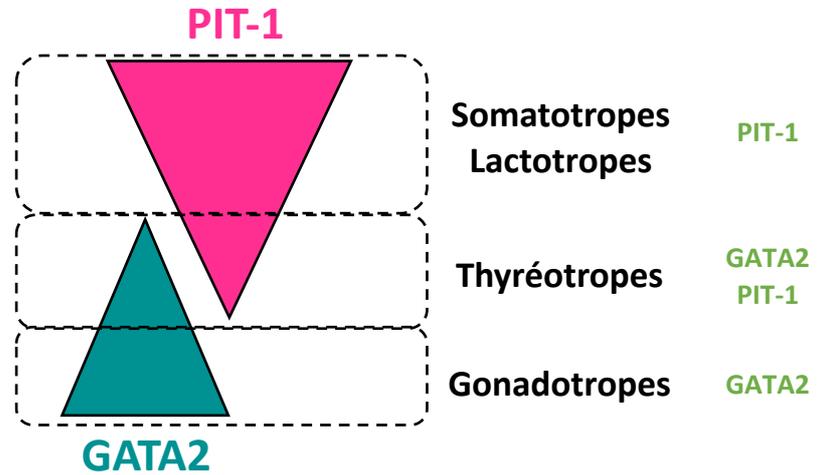
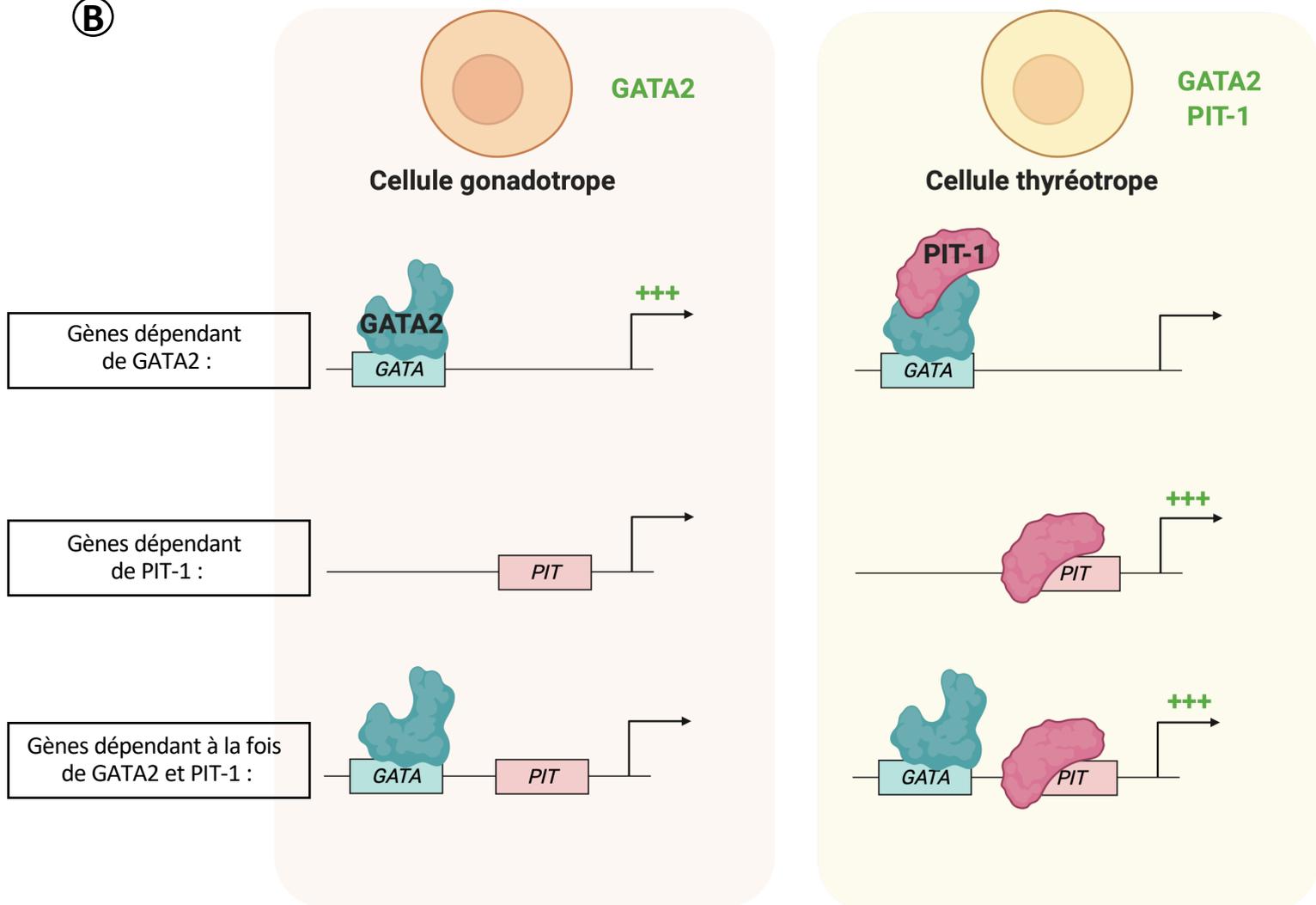
A**B**

Figure 18. Contrôle de la différenciation des cellules endocrines hypophysaires de l'adénohypophyse par les facteurs de transcription GATA2 et PIT-1. **A.** La différenciation des différents lignages endocrines de l'adénohypophyse s'effectue sous le contrôle de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription au sein de l'hypophyse. Parmi ces facteurs, qui s'établissent sous l'influence de gradients de morphogènes, se trouvent GATA2 (expression selon un gradient ventro-dorsal) et PIT-1 (expression selon un gradient dorso-ventral). Ainsi, les cellules gonadotropes n'expriment que GATA2 ; les cellules thyrotropes expriment à la fois GATA2 et PIT-1 ; les cellules somatotropes et lactotropes n'expriment que PIT-1. **B.** Représentation des différentes régulations géniques dans les cellules gonadotropes (à gauche), et les cellules thyrotropes (à droite). Lorsque seul GATA2 est exprimé comme dans les cellules gonadotropes, cela entraîne la transcription des gènes dépendants de GATA2, spécifiques du lignage gonadotrope. Mais ni les gènes dépendant de PIT-1 seul ou dépendant à la fois de GATA2 et PIT-1 ne sont transcrits. Dans les cellules thyrotropes, exprimant à la fois GATA2 et PIT-1, PIT-1 empêche l'effet *trans*-activateur de GATA2 sur les gènes dépendant de GATA2 seul. En revanche, les gènes dont l'expression dépend de PIT-1 seul ou conjointement avec GATA2 sont exprimés.

GATA2 dans ce territoire intermédiaire a pour conséquence de diminuer l'expression de PIT-1 et de faire disparaître l'essentiel du lignage thyroïdote de ce territoire (ainsi que des lignages somatotropes et lactotropes). En parallèle, on observe dans cette situation, l'apparition d'une population importante de cellules gonadotropes qui s'étend dorsalement. Inversement, la sur-expression ectopique de PIT-1, en utilisant un modèle murin transgénique *pCga-Pit-1*, a un effet miroir, conduisant à un enrichissement en cellules thyroïdotes au détriment des cellules gonadotropes. Un autre modèle plus subtil a consisté en la sur-expression ectopique d'un dominant négatif de GATA2, une forme non fonctionnelle de GATA2 interférant avec la fonction de GATA2 endogène. Ceci conduit à la disparition du lignage gonadotrope sans déclencher pourtant une expansion du lignage thyroïdote comme les expériences précédentes d'expression ectopique de la forme sauvage de GATA2 auraient pu le laisser suggérer. Au contraire, le lignage thyroïdote semble même être un peu réduit. L'ensemble de ces travaux indique donc que PIT-1 est un facteur pro-thyroïdote et anti-gonadotrope alors que GATA2 est nécessaire à la différenciation des deux lignages. Ces travaux révèlent, de plus, un antagonisme fonctionnel entre ces deux facteurs qui est au cœur de la différenciation des progéniteurs vers un devenir thyroïdote ou gonadotrope. Des expériences ultérieures ont montré, en effet, que GATA2 et PIT-1 interagissent physiquement et que cette interaction physique conduit à une inhibition réciproque des activités *trans*-activatrices de ces deux facteurs, mesurées dans un système de gène rapporteur. PIT-1, muté dans son domaine de liaison à GATA2 est, en effet incapable d'inhiber GATA2 *in vitro* et surtout, incapable de bloquer *in vivo* la différenciation du lignage gonadotrope (Dasen J S, *et al.* 1999) (Figure 18).

Cet exemple illustre qu'il existe des systèmes de balances moléculaires complexes qui permettent d'orienter la différenciation des cellules progénitrices non seulement en promouvant une différenciation particulière mais aussi en inhibant les autres différenciations possibles. Ces mécanismes concourent probablement à la différenciation harmonieuse des différents lignages en évitant l'apparition de lignages mixtes multi-hormonaux qui seraient délétères pour l'homéostasie hormonale de l'organisme. D'autres antagonismes entre voies de différenciation des lignages hypophysaires ont été mis à jour comme par exemple l'antagonisme mélanocorticoïde-gonadotrope dans lequel le facteur TBX19, favorisant la différenciation mélanocorticoïde, inhibe aussi activement la différenciation gonadotrope (Pulichino A-M, *et al.* 2003).

L'exemple du rôle de GATA2 dans la différenciation gonadotrope est aussi intéressant pour souligner la redondance entre les membres d'une même famille de FT. Alors que les études *in vitro* sur les lignées α T3-1 et L β T2 ont montré que GATA2 participe à l'activation des promoteurs des gènes *Cga*, *Lhb* et *Gnrhr*; paradoxalement, l'inactivation de *Gata2* spécifiquement dans l'hypophyse n'altère pas de façon significative la différenciation des lignages gonadotropes et thyrotropes. Malgré une légère diminution du nombre de ces cellules, les individus restent fertiles (Charles M A, *et al.* 2006). Pour réconcilier les différents modèles d'inactivation ou d'expression ectopique d'une forme sauvage ou d'un dominant négatif de GATA2, il faut envisager la possibilité d'une compensation fonctionnelle de GATA2 *in vivo* par un autre GATA, comme par exemple GATA3 qui est transitoirement exprimé dans l'hypophyse. Cette compensation serait impossible avec le dominant négatif de GATA2 puisqu'il est connu que celui-ci est capable d'antagoniser aussi les autres GATA (Smith V M, *et al.* 1995).

3.3.2.2 FOXL2, un activateur de la différenciation du lignage gonadotrope

Plusieurs FT sont connus pour influencer spécifiquement la différenciation du lignage gonadotrope parmi lesquels on trouve FOXL2, un FT de la famille des Forkheads. FOXL2 est connu pour participer à la différenciation des cellules de la granulosa et participer ainsi à la mise en place du phénotype ovarien (Cocquet J, *et al.* 2002). Dans l'hypophyse, il est exprimé très précocement, dès 11,5 jpc, dans la partie ventrale de la glande, à la fois dans les précurseurs, les cellules gonadotropes et les cellules thyrotropes (Ellsworth B S, *et al.* 2006). De façon cohérente, il est bien exprimé dans les cellules α T1-1, α T3-1 et L β T2 (données non publiées du laboratoire). Des études *in vitro* ont montré qu'il est impliqué dans l'expression des gènes *Cga*, *Gnrhr* et *Fshb*. *In vivo*, l'inactivation précoce de *Foxl2*, avant 12,5 jpc, entraîne une diminution de l'expression de ces gènes sans affecter toutefois l'expression de *Lhb*, ce qui a conduit les auteurs à suggérer que le lignage gonadotrope se différencierait tout de même (Justice N J, *et al.* 2011). De façon intéressante, une inactivation plus tardive de *Foxl2* dans les cellules gonadotropes, après 13,5 jpc, en utilisant une lignée transgénique exprimant une CRE recombinase sous le contrôle des éléments régulateurs du gène *Gnrhr* (lignée murine p*Gnrhr*-Cre) entraîne uniquement une chute de l'expression de *Fshb* (Tran S, *et al.* 2013). Ces résultats montrent que si FOXL2 est important pour l'initiation de l'expression de plusieurs gènes marqueurs du lignage gonadotrope, il n'est pas nécessaire pour leur maintien, à l'exception de *Fshb*. Ils suggèrent aussi que FOXL2 participe mais ne serait pas indispensable au processus global de la différenciation du lignage gonadotrope.

3.3.2.3 Combinatoires de facteurs de transcription : exemple de la régulation du gène *Gnrhr*

Les études *in vivo*, et notamment celles décrites précédemment, ont donc permis de comprendre le rôle de certains FT, pris isolément, dans la différenciation du lignage gonadotrope. Cependant, on sait aujourd'hui que les séquences *cis*-régulatrices sont régulées par un jeu de nombreux FT interagissant de façon fonctionnelle et parfois physique. L'étude de promoteurs en système rapporteur, notamment dans les lignées modèles α T3-1 et L β T2, a été nécessaire pour caractériser l'ensemble des FT impliqués dans la régulation des gènes gonadotropes et révéler la nécessité d'une combinatoire de FT. L'un des promoteurs les plus étudiés parmi les gènes spécifiques du lignage gonadotrope est le promoteur proximal du gène *Gnrhr* et les travaux du Dr J-N Laverrière, au laboratoire, ont permis une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes présidant à la régulation transcriptionnelle de ce gène clé de ce lignage.

Les études des mécanismes de régulation de l'expression du gène *Gnrhr* ont été conduites en combinant essentiellement trois approches : l'analyse de la conservation des séquences du promoteur du gène *Gnrhr* chez les mammifères (et notamment entre souris et rat), l'étude en système de gène rapporteur luciférase de l'impact de mutations des sites potentiels de fixation des FT conservés chez les mammifères sur l'activité du promoteur et enfin, l'analyse de la liaison des FT sur leurs sites, d'abord par de expériences de test de retard de migration électrophorétique (EMSA pour *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) puis par des expériences de ChIP. Ces différentes études ont montré que l'expression du gène du récepteur de la GnRH est contrôlée par une combinatoire de FT activateurs incluant des FT majeurs de la différenciation hypophysaire comme par exemple ISL1 (Schang A-L, *et al.* 2012), LHX3 (McGillivray S M, *et al.* 2005), PITX1 (Jeong K-H, *et al.* 2004), FOXL2 (Ellsworth B S, *et al.* 2003) ou encore NR5A1, dont nous reparlerons plus en détail dans le chapitre suivant.

De façon intéressante, notre laboratoire a montré que GATA2, classiquement décrit comme un activateur transcriptionnel, bloque l'activité *trans*-activatrice du promoteur de *Gnrhr* (Schang A-L, *et al.* 2013). Cette inhibition est complexe car elle repose sur la compétition entre GATA2 et un dimère activateur de protéines de la famille LIM, LHX3-ISL1. En effet, le promoteur du récepteur présente un site distal de liaison (-994/-961 chez le rat) de type LIRE (*LIM Responsive Element*) qui se superpose à un site GATA-RE (*GATA-Responsive Element*). Dans la lignée de cellules gonadotropes immatures α T3-1, dans laquelle les FT ISL1 et LHX3 sont exprimés de

façon importante alors que GATA2 l'est faiblement, les protéines LIM participent à l'activation du promoteur de *Gnrhr*. La sur-expression de GATA2 diminue l'activité du promoteur, probablement en interférant avec la fixation des protéines LIM sur l'élément composite LIRE-GATA-RE. Cette inhibition par encombrement stérique est probablement réciproque. En effet, *in vivo*, les cellules gonadotropes qui expriment seulement GATA2 n'expriment pas le récepteur de la GnRH alors que c'est le cas de celles exprimant à la fois GATA2 et ISL1, ce qui indique qu'ISL1 serait capable de déplacer GATA2 du promoteur et de s'opposer ainsi à ses effets inhibiteurs.

La régulation de l'expression du gène *Gnrhr* dans les cellules gonadotropes est donc complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs, susceptibles d'interagir positivement ou négativement. De façon intéressante, cette combinatoire est spécifique du type cellulaire concerné. Cet aspect a été étudié au laboratoire en développant un modèle murin original de transgénèse qui a permis de suivre précisément *in vivo* l'activité de ce promoteur et d'en étudier la régulation. Ce modèle reposait sur l'analyse *in vivo* de l'expression d'un gène rapporteur, celui de la Phosphatase Alcaline humaine, qui était placé sous le contrôle du promoteur du *Gnrhr* de rat. L'expression du transgène pouvant être détectée avec une grande sensibilité et une forte résolution, ceci a permis de montrer que l'activité du promoteur de *Gnrhr* pouvait être détectée très précocement (dès 13 jpc) dans l'hypophyse et était co-localisée avec l'expression de FT comme NR5A1, ISL1 ou LHX3 (Granger A, *et al.* 2004). Ce modèle a aussi révélé que le promoteur de *Gnrhr* s'exprime dans plusieurs sites extra-hypophysaires, certains déjà connus pour exprimer le *Gnrhr* comme l'hippocampe et les gonades, mais aussi dans d'autres, comme la glande pinéale ou la rétine, dans lesquels la présence du *Gnrhr* n'avait jamais été encore rapportée (Granger A, *et al.* 2004 ; Schang A-L, *et al.* 2011 ; Schang A-L, *et al.* 2013). De façon intéressante, dans ces tissus extra-hypophysaires, la combinatoire de FT est différente de celle observée dans le lignage gonadotrope au cours de sa différenciation. Par exemple, dans l'hippocampe, l'activation du promoteur ne fait pas intervenir les facteurs NR5A1, ISL1 ou LHX3, nécessaires dans l'hypophyse, mais des facteurs comme NUR77 (*Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 1*) et c-FOS (*Cellular Oncogene C-Fos*) (Schang A-L, *et al.* 2011). De même, dans la rétine, le gène *Gnrhr* ne s'exprime qu'après activation de son promoteur par à la fois des facteurs communs au lignage gonadotrope comme ISL1 et LHX3 mais aussi des facteurs plus spécifiques comme OTX2 (*Orthodenticle Homeobox 2*) et PROP1 (Schang A-L, *et al.* 2013).

Dans le lignage gonadotrope, l'un des FT majeurs de l'initiation de la transcription du gène *Gnrhr* est NR5A1. En effet, les gènes *Nr5a1* et *Gnrhr* sont les marqueurs spécifiques du lignage gonadotrope les plus précoces au cours de l'embryogenèse et NR5A1 est indispensable, comme nous allons le voir, à l'expression des gènes clefs des cellules gonadotropes dont le gène *Gnrhr*.

3.3.2.4 NR5A1, un gène majeur de la différenciation du lignage gonadotrope

Si le rôle de GATA2 ou de FOXL2 dans la différenciation gonadotrope est ambigu, celui de NR5A1 est indiscutable. *Nr5a1*, encore appelé *Sf-1* (*Steroidogenic Factor-1*) et plus rarement *Ad4bp* (*Adrenal 4 Binding Protein*), code un FT de la famille des récepteurs nucléaires. Dans l'hypophyse, il est détecté spécifiquement dans les cellules gonadotropes dès 13,5 jpc, son expression précédant ainsi celle de l'ensemble des gènes marqueurs spécifiques de ce lignage (*Gnrhr*, *Lhb* et *Fshb*). De ce fait, c'est actuellement le marqueur le plus précoce connu du lignage gonadotrope hypophysaire. On peut donc définir plus précisément le lignage gonadotrope comme étant les cellules hypophysaires qui expriment non seulement le *Gnrhr* et les gènes des sous-unités des gonadotropines mais aussi *Nr5a1*. L'inactivation de *Nr5a1* qu'elle soit globale ou restreinte à l'hypophyse (en utilisant un modèle transgénique *pCga-Cre*) entraîne une perte complète de l'expression de tous les gènes marqueurs de ce lignage et donc une disparition du lignage gonadotrope (Shinoda K, *et al.* 1995 ; Zhao L, *et al.* 2001). On peut noter, toutefois, que les souris invalidées pour *Nr5a1* dont l'axe gonadotrope est fortement stimulé de façon exogène par un traitement par la GnRH expriment des niveaux très faibles mais détectables de LH et de FSH (Ikeda Y, *et al.* 1995). Ceci s'explique très probablement par un mosaïcisme de la délétion de *Nr5a1* par la CRE recombinase, plutôt que par des potentielles compensations fonctionnelles (Zhao L, *et al.* 2001). Des mutations de NR5A1 chez l'humain entraînent des phénotypes pathologiques hypophysaires similaires à ceux retrouvés chez la souris. Enfin, *in vitro*, NR5A1 a été montré comme étant un *trans*-activateur essentiel de l'expression des gènes marqueurs du lignage, incluant le gène *Gnrhr* (c.f. plus haut), confirmant son rôle central dans la différenciation du lignage gonadotrope.

Comprendre la régulation de l'expression de *Nr5a1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope est donc essentiel pour comprendre les étapes précoces de ce processus. Dans le chapitre qui suit, je présenterai donc ce que l'on connaît de la régulation de ce FT.

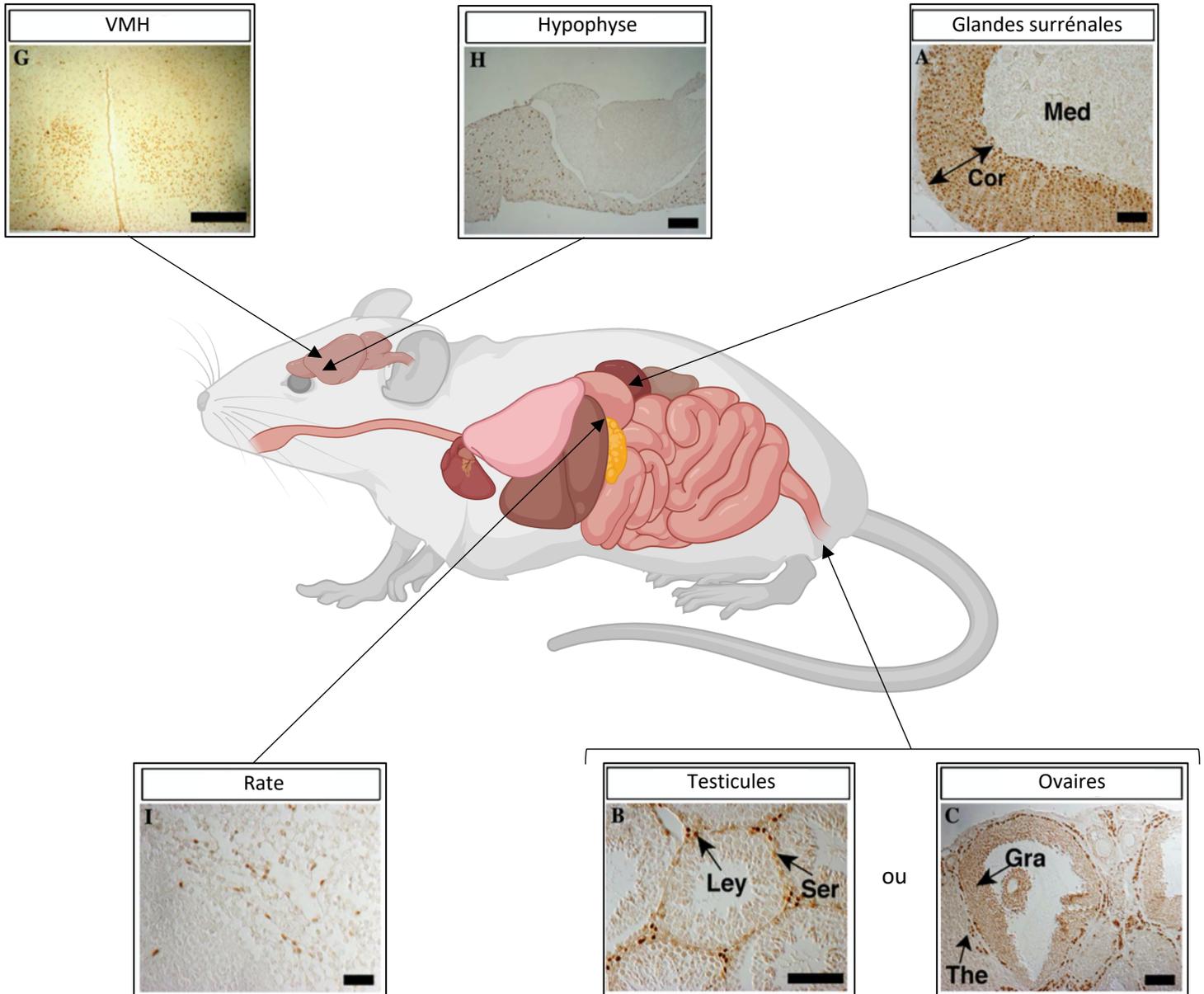


Figure 19. Localisation cellulaire de NR5A1 dans ses différents tissus d'expression chez la souris. NR5A1 est exprimé dans les différents tissus présentés ci-dessus : l'hypothalamus ventro-médian, l'hypophyse (cellules gonadotropes hypophysaires), la rate, les glandes surrénales (dans les cellules du cortex, **Cor**, mais pas dans les cellules de la médulla, **Med**), dans les testicules (cellules de Leydig, **Ley**, et de Sertoli, **Ser**), dans l'ovaire (cellules de la granulosa, **Gra**, et de la thèque, **The**). L'expression de NR5A1 dans le placenta et les cellules lutéales du corps jaune ovarien n'est pas représentée ici. Les différentes images d'immunohistochimie sont issues de la publication de Fatchiyah, *et al.* 2006.

4. Expression et régulation de *Nr5a1*

4.1 Ontogenèse et expression tissulaire de NR5A1

4.1.1 Découverte et description succincte de NR5A1

NR5A1 a été d'abord identifié dans les années 1990 comme un FT se fixant sur un motif « AGGTCA », présent notamment dans le promoteur de nombreux gènes de la stéroïdogénèse. Il a été impliqué dans la régulation de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse, ce qui explique sa dénomination SF-1 pour *Steroidogenic Factor-1* (Honda S, *et al.* 1993).

Comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, NR5A1 est activé par liaison avec son ligand. Initialement considéré comme étant un récepteur nucléaire orphelin, sans ligand identifié, il est maintenant établi qu'il lie des phospholipidiques endogènes comme les phosphatidyl-inositols ce qui contribuerait à son activité de régulation transcriptionnelle (Krylova I N, *et al.* 2005 ; Li Y, *et al.* 2005 ; Sablin E P, *et al.* 2009).

4.1.2 Expression et rôles de NR5A1 chez la souris

L'expression de NR5A1 n'est pas limitée aux cellules gonadotropes hypophysaires. En effet, il est présent aussi dans des tissus stéroïdogéniques (gonades des deux sexes, glandes surrénales et placenta) ainsi que dans un ensemble de tissus non stéroïdogéniques comme la rate, l'hypothalamus ventro-médian (VMH) et bien sûr les cellules gonadotropes hypophysaires (Figure 19). Dans ces différents tissus, NR5A1 a été identifié comme étant impliqué dans les processus de développement et de différenciation cellulaire et il participe aussi au fonctionnement de ces organes (Parker K L et Schimmer B P, 1997 ; Lin L et Achermann J C, 2008 ; Schimmer B P et White P C, 2010).

De ce fait, des mutations de NR5A1 chez l'humain ou son invalidation constitutive chez la souris (Luo X, *et al.* 1994 ; Shinoda K, *et al.* 1995 ; Sadovsky Y, *et al.* 1995) ne se limitent pas à entraîner un hypogonadisme hypogonadotrope et une stérilité mais provoquent des phénotypes pléiotropes sévères comme :

- Une agénésie gonadique, avec une réversion sexuelle mâle vers femelle des organes génitaux internes et externes (Luo X, *et al.* 1994 ; Sadovsky Y, *et al.* 1995) ;

- Une agénésie des glandes surrénales qui entraîne une mortalité embryonnaire dès la naissance par défaut de stéroïdes surrénaliens (des injections de gluco et minéralocorticoïdes ou une transplantation des glandes surrénales permettent le maintien en vie ; Luo X, *et al.* 1994 ; Majdic G, *et al.* 2002) ;
- Des défauts dans la formation des noyaux du VMH se traduisant par des neurones immatures et mal localisés (Büdefeld T, *et al.* 2011) ;
- Des défauts de la fonction de la rate (clairance anormale des cellules sanguines ; Morohashi K, *et al.* 1999) ;
- Et enfin, une différenciation anormale des cellules gonadotropes (Shinoda K, *et al.* 1995 ; Ingraham H A, *et al.* 1994).

Les invalidations conditionnelles, tissus spécifiques, ont permis d'étudier plus finement la contribution de NR5A1 dans la régulation de différents processus physiologiques (Zhao L, *et al.* 2001 ; Jeyasuria P, *et al.* 2004 ; Zhao L, *et al.* 2008 ; Anamthathmakula P, *et al.* 2019) :

- Dans le VMH, NR5A1 est notamment impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique, de l'anxiété et du comportement sexuel femelle et notamment de la lordose (Zhao L, *et al.* 2008 ; Kim K W, *et al.* 2010 ; pour revue : Büdefeld T, *et al.* 2012) ;
- Dans les ébauches de gonades mâles, il est impliqué dans la différenciation sexuelle en contrôlant notamment la différenciation et la survie des cellules de Sertoli et de Leydig (Anamthathmakula P, *et al.* 2019). Chez la femelle au contraire, son expression est initialement réprimée et il ne serait pas nécessaire pour la différenciation ovarienne (Takasawa K, *et al.* 2014). L'expression de NR5A1 apparaît à nouveau plus tardivement et ce facteur serait essentiel pour la fonction stéroïdogène ovarienne (Pelusi C, *et al.* 2008) ;
- Dans la différenciation et la régulation de la stéroïdogénèse des glandes surrénales (Parker K L et Schimmer B P, 1997 ; Buaas F W, *et al.* 2012) ;
- Dans la fonction gonadotrope hypophysaire, comme l'atteste le phénotype d'hypogonadisme hypogonadotrope suite à son invalidation spécifique dans l'hypophyse (Zhao L, *et al.* 2001).

4.2 Régulation de l'expression de *Nr5a1*

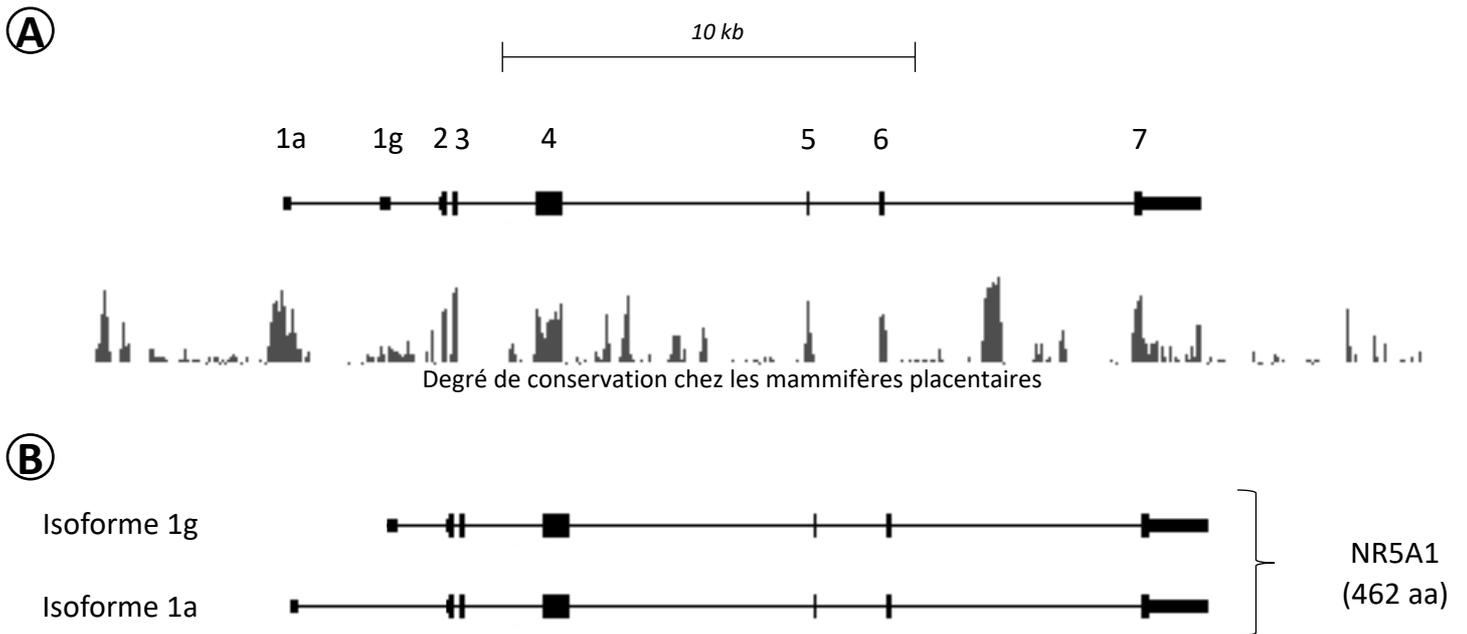


Figure 20. Description du locus du gène *Nr5a1* chez la souris. **A.** Structure du gène *Nr5a1* et sa conservation chez les mammifères placentaires (extrait de UCSC). Le gène codant *Nr5a1* est composé de 8 exons : deux exons 1 alternatifs non codants (1a et 1g), et 6 exons codants (de 2 à 7). La conservation de la séquence génomique du locus de *Nr5a1* chez les mammifères placentaires est représentée sous le locus de *Nr5a1*. La hauteur des pics reflète le niveau de conservation (d'après UCSC). **B.** Le gène *Nr5a1* code deux isoformes de transcrits chez la souris, appelées isoforme 1g (pour l'utilisation de l'exon 1g) ou isoforme 1a (pour l'utilisation de l'exon 1a). Ces deux isoformes codent une même protéine de 462 acides aminés (aa) chez la souris.

4.2.1 Description du locus de *Nr5a1*

Le gène codant NR5A1 est localisé sur le chromosome 2 chez la souris (Taketo M, *et al.* 1995). Il existe deux isoformes du transcrit, produits à partir de deux promoteurs distincts qui aboutissent néanmoins à la traduction d'une même protéine de 462 acides aminés (Kimura R, *et al.* 2000). En effet, les deux transcrits de *Nr5a1* sont tous deux composés des exons 2 à 7, codant la totalité de la phase ouverte de lecture mais contiennent chacun un exon 1 alternatif : l'exon 1a ou 1g. L'utilisation du promoteur 1A conduira à la transcription de l'exon 1a et à l'isoforme 1a du transcrit de *Nr5a1* alors que le promoteur 1G donnera, de façon analogue, l'isoforme 1g du transcrit (Figure 20). Ces deux isoformes sont différenciellement exprimées dans les tissus exprimant *Nr5a1* (Kimura R, *et al.* 2000). Chez la souris adulte, l'isoforme 1a est majoritaire dans les gonades, les glandes surrénales, l'hypothalamus et la rate. L'hypophyse est le seul site d'expression où l'isoforme 1g de *Nr5a1* est majoritairement exprimée.

4.2.2 Les différentes séquences *cis*-régulatrices de *Nr5a1*

4.2.2.1 Apport des modèles de souris transgéniques

A ces deux séquences *cis*-régulatrices proximales, différenciellement utilisées selon le tissu, s'ajoute un panel de séquences *cis*-régulatrices distales de type *enhancer* (Figure 21). La première indication de l'existence de tels *enhancers* provient de l'étude de la conservation de la séquence génomique du locus du gène. En effet, on peut noter qu'en plus d'îlots fortement conservés qui correspondent aux exons, de petites régions situées en amont des promoteurs ou dans les introns présentent une conservation de séquence importante, signe d'une contrainte évolutive. Cette forte conservation est en faveur d'une fonction régulatrice potentielle de ces régions. La démonstration formelle de l'existence d'*enhancers* dans le locus de *Nr5a1* provient d'études *in vivo* chez la souris transgénique exprimant des gènes rapporteurs. Ces études ont été conduites essentiellement dans le laboratoire du Dr Parker et ont consisté à tester le potentiel régulateur de fragments génomiques de taille variable du locus de *Nr5a1* insérés dans des vecteurs de type BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) ou YAC (*Yeast Artificial Chromosome*). Ces études ont révélé que les promoteurs du gène pris isolément ne sont pas capables d'induire l'expression du gène rapporteur β -Galactosidase dans la majorité des tissus connus pour exprimer *Nr5a1*, la β -Galactosidase n'étant en effet détectée que dans les gonades indifférenciées. D'autres séquences régulatrices seraient donc nécessaires pour diriger l'expression de *Nr5a1* dans les sites d'expression extra-gonadiques (Wilhelm D et Englert C, 2002). L'utilisation d'un fragment génomique plus grand a révélé que la séquence de 50 kbp en

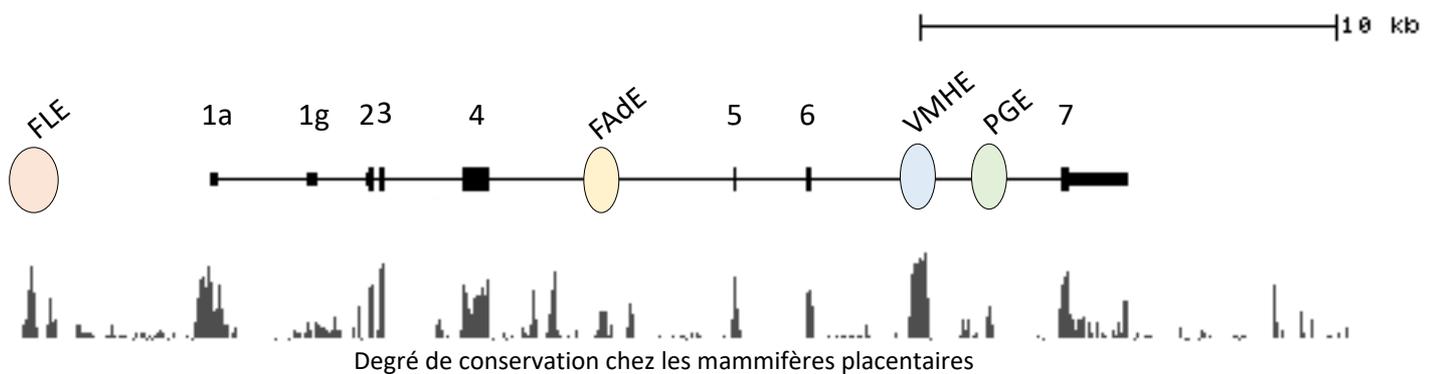


Figure 21. Les différentes séquences *cis*-régulatrices de type *enhancer* de *Nr5a1* identifiées chez la souris. L'expression de *Nr5a1* dans l'ensemble de ses tissus cibles est sous le contrôle des séquences régulatrices promotrices (1a ou 1g) et de séquences régulatrices distales, les *enhancers*, qui permettent de réguler l'expression spatiale et temporelle de *Sf-1*. Quatre *enhancers* ont été à ce jour identifiés, dirigeant l'expression de *Nr5a1* dans les cellules de Leydig fœtales (FLE : *Fetal Leydig Enhancer*, orange), dans les cellules surrénaliennes fœtales (FAdE : *Fetal Adrenal Enhancer*, jaune), dans les cellules du VMH (VMHE : *Ventromedial Hypothalamus Enhancer*, bleu) et dans les cellules gonadotropes hypophysaires (PGE : *Pituitary Gonadotrope Enhancer*, vert). Le FLE est localisé en amont du gène codant *Nr5a1*, le FAdE est localisé dans le quatrième intron du gène tandis ce que le VMHE et PGE sont tous deux localisés dans le sixième intron du gène. La conservation de la séquence génomique du locus de *Nr5a1* chez les mammifères placentaires est représentée sous le locus de *Nr5a1*. La hauteur des pics reflète le niveau de conservation (d'après UCSC).

amont de l'ATG du locus de *Nr5a1* permet l'expression de *Nr5a1* dans les gonades différenciées, les glandes surrénales et le VMH (Stallings N R, *et al.* 2002). Dans cette situation, le transgène ne peut toutefois pas être détecté dans les cellules gonadotropes hypophysaires. Le patron d'expression du transgène ne se superpose avec l'expression endogène de *Nr5a1* que lorsque l'ensemble du locus du gène est utilisé (Karpova T, *et al.* 2005 ; Bingham N C, *et al.* 2006).

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence que la régulation de l'expression du gène *Nr5a1* implique non seulement les séquences promotrices, mais aussi et surtout un jeu de séquences régulatrices distales réparties sur l'ensemble du locus, requises pour une expression spatiale et temporelle adéquate de ce gène dans l'ensemble de l'organisme.

4.2.2.2 Les *enhancers* de *Nr5a1*

L'expression de *Nr5a1* est permise dans chacun de ses tissus d'expression par l'existence d'un *enhancer* particulier (Figure 21). Pour certains des tissus, cet *enhancer* est impliqué uniquement dans l'expression de *Nr5a1* au stade fœtal et la ou les séquences régulatrices permettant l'expression au stade adulte ne sont pas encore caractérisées. Les différents *enhancers* ont été essentiellement caractérisés par les travaux de l'équipe du Dr Morohashi.

- L'*enhancer* FLE, spécifique des cellules de Leydig fœtales

Il existe, au cours du temps, deux types de populations de cellules de Leydig dans le testicule : une première population qui se différencie au cours du développement embryonnaire constituée de cellules dénommées Leydig fœtales et une seconde population, qui s'établit après la naissance, et définit les cellules de Leydig adultes (Teerds K J et Huhtaniemi I T, 2015). *Nr5a1* est exprimé dans ces deux types de cellules de Leydig et participe à la régulation de la stéroïdogénèse mâle.

Une séquence localisée dans la région intergénique entre *Nr5a1* et le gène adjacent *Nr6a1* a été identifiée comme étant un *enhancer* permettant l'expression du gène *Nr5a1* dans les cellules de Leydig fœtales. Cet *enhancer* a été, à ce titre, nommé *Fetal Leydig Enhancer* (FLE). Il est nécessaire, conjointement avec le promoteur de *Nr5a1*, pour diriger l'expression d'un gène rapporteur dans les cellules de Leydig fœtales dès 12,5 jpc. Cette séquence n'est cependant pas impliquée dans l'expression de *Nr5a1* dans les cellules de Leydig adultes. L'étude de cet *enhancer* par mutagenèse ciblée a permis d'identifier deux sites de fixation essentiels pour son

activité : un site de fixation de type E-box, dont le facteur n'a pas été encore identifié, et un site de fixation fonctionnel pour *Nr5a1* lui-même. La fixation de *Nr5a1* sur l'enhancer FLE permettrait ainsi une boucle d'auto-amplification de son activité (Shima Y, *et al.* 2012). Cet *enhancer* est fonctionnel et crucial *in vivo* puisque la délétion de sa séquence par stratégie CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9*) chez la souris entraîne une absence de différenciation des cellules fœtales de Leydig et *in fine* des cellules adultes de Leydig (Shima Y, *et al.* 2018).

- L'enhancer FAdE, spécifique des cellules surrénaliennes fœtales

Au cours de l'embryogenèse, les cellules corticosurrénales fœtales forment une structure intermédiaire appelée « zone X », qui régresse et disparaît lors de la puberté chez le mâle ou lors de la première grossesse chez la femelle. Ces cellules sont remplacées par des cellules adultes qui prolifèrent dès la fin de la vie embryonnaire (Keegan C E et Hammer G D, 2002 ; Wood M A et Hammer G D, 2010).

Une séquence de 379 bp, localisée dans le quatrième intron de *Nr5a1*, a été identifiée comme étant un *enhancer* permettant de diriger l'expression du gène *Nr5a1* dans les cellules corticosurrénales fœtales. Elle a été dénommée *Fetal Adrenal Enhancer* (FAdE). Cette séquence dirige l'expression d'un gène rapporteur dans les cellules fœtales du primordium surrénalien dès 10,5 jpc. L'expression du transgène s'atténue cependant après 17,5 jpc pour se restreindre à la « zone X » des glandes surrénales, avant de disparaître à l'âge adulte (Zubair M, *et al.* 2006). La séquence génomique de FAdE est très conservée chez les vertébrés. L'étude fonctionnelle de cet *enhancer* a permis de révéler les mécanismes impliqués dans l'émergence de l'expression de *Nr5a1* dans les cellules corticosurrénales. L'activité de l'enhancer est initiée par l'action de deux complexes protéiques hétérodimériques susceptibles de se fixer sur des sites PBX/PREP et PBX/HOX. L'invalidation de PBX1 chez des souris est d'ailleurs associée non seulement à des anomalies du développement des glandes surrénales mais aussi à la perte de l'expression de *Nr5a1* dans ce tissu. Ceci suggère que PBX1 contrôlerait le développement des glandes surrénales en contrôlant notamment l'expression de *Nr5a1* par l'intermédiaire de l'activation de l'enhancer FAdE. Cet *enhancer* contient également des sites de fixation pour NR5A1 qui sont fonctionnels *in vitro*. Cette boucle de régulation par NR5A1 est impliquée dans l'activité de l'enhancer, mesurée par le maintien de l'expression du gène rapporteur dans les cellules du primordium surrénalien, mais également dans son inactivation (Xing Y, *et al.* 2017). Les auteurs ont en effet montré *in vitro* que l'inactivation de cet *enhancer*

était médiée par une SUMOylation de NR5A1, entraînant le recrutement de DAX-1, un co-inhibiteur de NR5A1. Ces données ont été confirmées par l'étude *in vivo* de souris génétiquement modifiées, des souris portant la mutation NR5A1 2KR/2KR qui empêche la SUMOylation de la protéine et donc l'interaction avec DAX-1, ou bien des souris invalidées pour DAX-1. Ces deux modèles de souris présentent un retard d'inactivation de l'*enhancer* FAdE, associé à un retard de la régression de la « zone X », démontrant l'importance de cet *enhancer* dans la régulation de l'expression de *Nr5a1* dans les cellules du cortex surrénalien.

- L'*enhancer* VMHE, spécifique des neurones du VMH

Une séquence de 503 bp, dénommée *VMH Enhancer* (VMHE) et localisée dans le sixième intron de ce gène, a été identifiée comme étant un *enhancer* permettant de diriger spécifiquement l'expression de *Nr5a1* dans les neurones du VMH. Cette séquence est nécessaire et suffisante pour diriger l'expression spécifique d'un gène rapporteur dans les cellules du VMH dès 9,5 jpc chez la souris. Cette séquence, très conservée chez les vertébrés, contient des sites de fixation importants pour spécifier l'expression de *Nr5a1* dans le VMH. Par mutagenèse, certains de ces sites ont été identifiés comme fixant des FT suppresseurs, empêchant donc l'expression ectopique du gène rapporteur, ou fixant des FT activateurs (probablement des protéines à Homéodomaine). Ces FT restent cependant à être identifiés (Shima Y, *et al.* 2005).

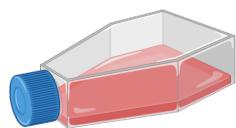
- L'*enhancer* PGE, spécifique des cellules gonadotropes hypophysaires

Enfin, une séquence de 486 bp, dénommée PGE (*Pituitary Gonadotrope Enhancer*) et localisée dans le sixième intron de ce gène, a été identifiée comme étant un *enhancer* permettant de spécifier l'expression de *Nr5a1* dans les cellules gonadotropes hypophysaires. Cette séquence, très conservée chez les vertébrés, permet de diriger l'expression d'un gène rapporteur dès 13,5 jpc. Elle contient un site de fixation fonctionnel pour le FT PITX2, connu pour être impliqué dans le développement hypophysaire et la différenciation des cellules gonadotropes. Ce site est essentiel à son activité. L'*enhancer* PGE contient aussi trois autres régions conservées, elles aussi nécessaires à son activité mais les facteurs s'y liant n'ont pas été encore identifiés. Enfin, il contient un site de fixation pour EGR1 (*Early Growth Response 1*) qui n'est cependant pas indispensable à son activité (Shima Y, *et al.* 2008).



In vivo

Shima Y, et al. 2008



In vitro

Laverrière J-N, et al. 2016

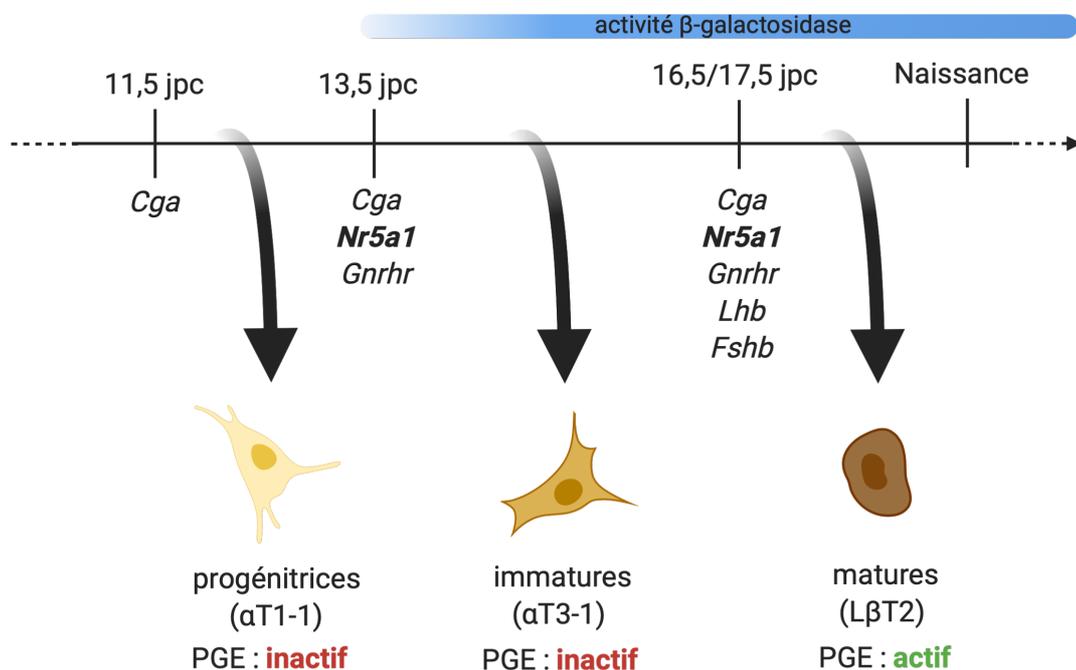


Figure 22. L'enhancer gonadotrope hypophysaire PGE. L'expression de *Nr5a1* dans les cellules gonadotropes hypophysaires est sous le contrôle de séquences promotrices et d'un *enhancer* appelé PGE (*Pituitary Gonadotrope Enhancer*). Des approches *in vivo* (Shima Y, et al. 2008) plaçant le gène rapporteur de la β-galactosidase sous contrôle de cet *enhancer* ont conduit à l'idée qu'il serait nécessaire pour initier l'expression de *Nr5a1* dès 13,5 jpc dans les cellules gonadotropes hypophysaires murines. Cependant, des études *in vitro* (Laverrière J-N, et al. 2016) sur des lignées récapitulant les trois stades phénotypiques de la différenciation gonadotrope (progénitrices αT1-1, gonadotropes immatures αT3-1 et gonadotropes matures LβT2) ont démontré que l'enhancer PGE n'est actif que dans les stades matures de la différenciation de ce lignage et non dans les stades immatures où *Nr5a1* est pourtant déjà exprimé.

L'étude ayant permis d'identifier l'*enhancer* PGE postulait que cet *enhancer* était essentiel pour l'expression de *Nr5a1* à un stade très précoce de la différenciation du lignage gonadotrope. Ce postulat n'a cependant pas été confirmé par une étude épigénétique menée au laboratoire sur les trois lignées murines immortalisées récapitulant trois stades phénotypiques de la différenciation de ces cellules présentées précédemment (§3.3.1). En effet, en mesurant le statut épigénétique (marques d'histones, méthylation de l'ADN et l'accessibilité de la chromatine) de l'*enhancer* PGE, cette étude a mis évidence que l'*enhancer* est inactif dans le modèle de cellules gonadotropes immatures, alors que *Nr5a1* est déjà exprimé à ce stade. Dans les cellules immatures, l'*enhancer* PGE présente, en effet, un état chromatinien réprimé, combinant méthylation des CpG, faible accessibilité chromatinienne et absence de la marque activateur H3K27ac. De plus, l'*enhancer* PGE est incapable d'activer l'expression d'un gène rapporteur luciférase dans ces cellules immatures, alors qu'il est pleinement actif dans les cellules gonadotropes matures (Laverrière J-N, *et al.* 2016) (Figure 22). Cette étude remet donc en cause l'implication de cet *enhancer* dans l'initiation de l'expression de *Nr5a1* lors des étapes précoces de la différenciation du lignage gonadotrope. L'*enhancer* permettant l'émergence de *Nr5a1* dans le lignage gonadotrope restait donc à découvrir et ceci a fait l'objet de mes travaux de recherche.

II. OBJECTIFS

Comme nous avons pu le voir précédemment, NR5A1 est un FT essentiel pour la différenciation et le fonctionnement des cellules gonadotropes et *in fine* la fonction de reproduction. En dépit de son rôle majeur, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'initiation de son expression dans les cellules gonadotropes demeuraient encore mal caractérisés à l'époque où j'ai débuté ma thèse. Au cours de mes travaux de recherche, je me suis donc intéressé à identifier :

- 1 L'ensemble des séquences régulatrices de l'expression de *Nr5a1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire, ce qui a abouti à la publication d'un article (**Pacini V et al., *Epigenetics & Chromatin*, 2019**)
- 2 Les mécanismes moléculaires (FP et autres régulateurs) et épigénétiques initiant l'expression de *Nr5a1* dans les cellules gonadotropes, un aspect encore en cours d'étude au laboratoire.

III. RÉSULTATS PUBLIÉS : Identification d'un nouvel *enhancer* activé par ER α et impliqué dans l'initiation de l'expression de *Nr5a1* dans le lignage gonadotrope.

Introduction et résultats principaux de l'article

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les mécanismes moléculaires connus pour réguler l'émergence de *Nr5a1* au cours de la différenciation des cellules gonadotropes étaient remis en question lors de mon arrivée au laboratoire. En effet, l'étude épigénétique conduite au laboratoire en 2016 avait montré que l'*enhancer* PGE décrit par le Dr Morohashi comme responsable de l'expression de *Nr5a1* dans l'hypophyse de souris (Shima Y, *et al.* 2008) n'était, en fait, pas actif dans le modèle de cellules gonadotropes immatures α T3-1, alors même que *Nr5a1* y est déjà bien exprimé (Laverrière J-N, *et al.* 2016).

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'émergence de *Nr5a1*, nous avons mis à profit les trois lignées murines modèles de la différenciation des cellules gonadotropes pour conduire une étude épigénomique de la différenciation du lignage gonadotrope, ce qui n'avait jamais encore été fait. Pour identifier l'ensemble des régions *cis*-régulatrices potentielles du génome et notamment celles localisées dans le locus de *Nr5a1*, nous avons mesuré l'accessibilité de la chromatine par la technique d'ATAC suivie de séquençage haut-débit dans les trois modèles cellulaires. Comme nous l'avons vu précédemment, l'accessibilité de la chromatine est un paramètre assez bien corrélé avec le niveau d'activité des séquences *cis*-régulatrices. Dans un premier temps, nous avons montré que l'accessibilité de la chromatine des séquences *cis*-régulatrices de plusieurs gènes clés comme *Isl1*, *Gnrhr* ou *Lhb*, est parfaitement cohérente avec l'expression génique dans ces différentes lignées (Figure additionnelle 1 de l'article), validant de fait notre approche. Une fois cette validation effectuée, nous nous sommes concentrés sur le locus de *Nr5a1*. Nous avons observé qu'au niveau de l'*enhancer* hypophysaire PGE situé dans l'intron 6 (Shima Y, *et al.* 2008), la chromatine n'est effectivement pas accessible dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1 alors qu'elle l'est pleinement dans la lignée mature L β T2. Ceci est en accord avec les résultats de la précédente étude menée au laboratoire et confirme, par une autre approche expérimentale, que l'*enhancer* PGE ne peut être impliqué dans l'initiation de l'expression de *Nr5a1* lors de l'émergence du lignage gonadotrope. L'étude de l'accessibilité chromatinienne nous a permis d'identifier une autre région génomique, localisée dans le quatrième intron du gène *Nr5a1*, dont la chromatine est spécifiquement accessible à ce stade de différenciation (Figure 1 de l'article). Cette région, que nous avons appelée région α (par opposition à l'*enhancer* PGE que nous avons renommé

enhancer β) était donc un *enhancer* potentiel de *Nr5a1*. Afin de confirmer *in vivo* ces résultats, nous avons effectué une étude de l'accessibilité de la chromatine au niveau de ces régions d'intérêt dans des hypophyses embryonnaires à différents stades de développement à 12,5, 13,5 et 14,5 jpc. De façon cohérente avec nos résultats sur les lignées cellulaires, nous avons montré que la chromatine de la région α est accessible de façon transitoire à 13,5 jpc, avec l'apparition des premières cellules gonadotropes, alors que l'accessibilité de l'*enhancer* β ne devient significative qu'à partir de 14,5 jpc (Figure 1 de l'article).

Afin de démontrer que cette région correspondait bien à un *enhancer*, j'ai ensuite étudié les marques épigénétiques qui y étaient déposées. En caractérisant les marques d'histone par immunoprécipitation de la chromatine ainsi que la méthylation des CpG dans la séquence de la région α , j'ai démontré que cette région est un *enhancer* spécifiquement actif dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1. En effet, j'ai détecté la présence combinée des marques H3K4me1, H3K27ac et une hypométhylation de la séquence α uniquement dans ces cellules. De façon intéressante, j'ai observé que la marque H3K4me1, spécifique des *enhancers*, était présente dès le stade progéniteur et se maintenait au stade mature. Cependant, à ce stade, cette marque est combinée à un faible enrichissement en H3K27ac et à une hyperméthylation de l'ADN. Ces résultats montrent donc que même si cet *enhancer* n'est activé qu'au moment de l'émergence de l'expression de *Nr5a1*, il n'en est pas moins marqué comme *enhancer* avant et après son moment d'activation (Figure 2 de l'article). Au cours des différentes étapes de la différenciation gonadotrope, cet *enhancer* serait donc inactivé sans être pour autant démantelé. Pour vérifier le rôle régulateur de l'*enhancer* α sur l'expression de *Nr5a1*, nous avons effectué deux approches : nous avons étudié, dans un premier temps, l'interaction potentielle de l'*enhancer* α avec le promoteur hypophysaire du gène *Nr5a1* par la technique de 3C. Ceci nous a permis de mettre en évidence que, bien qu'éloignées sur l'ADN linéaire (plus de 5000 bp), ces deux séquences sont, en réalité, rapprochées par un repliement génomique dans le noyau des cellules gonadotropes immatures. Dans un second temps, afin de déterminer si l'interaction *enhancer*/promoteur étant fonctionnelle, j'ai spécifiquement délété la séquence génomique de l'*enhancer* α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1 par la stratégie CRISPR-Cas9. La délétion de cette séquence entraîne une réduction drastique de l'expression de *Nr5a1*, démontrant donc que l'*enhancer* α est une séquence régulatrice cruciale pour l'expression de *Nr5a1* dans les cellules gonadotropes immatures (Figure 3 de l'article). Il s'agit donc de l'*enhancer* le plus précoce connu à ce jour pour être impliqué dans la régulation de l'expression de *Nr5a1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope. Son recrutement précède donc celui de l'*enhancer* β .

L'analyse bio-informatique de la séquence génomique de l'*enhancer* α a révélé un site de liaison de type ERE (*Estrogen Response Element*) susceptible de lier les récepteurs nucléaires des œstrogènes, qui est conservé chez les mammifères. J'ai montré, par RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), que seul le récepteur α des œstrogènes, ER α , est exprimé dans les cellules gonadotropes immatures. J'ai, de plus, vérifié, par immunoprécipitation de la chromatine, qu'ER α se fixait effectivement sur l'*enhancer* α . J'ai établi qu'ER α est un FT indispensable à l'activité de cet *enhancer* puisque la diminution de son expression par ARN interférents inactive totalement l'activité de l'*enhancer* mesurée en système rapporteur luciférase. De plus, j'ai mis en évidence, par des approches pharmacologiques, que l'action d'ER α est dépendante de son activation par son ligand, l'œstradiol (Figure 4 de l'article).

Afin d'élucider les mécanismes moléculaires et notamment épigénétiques par lesquels ER α régule l'*enhancer* α , j'ai modifié, par la stratégie CRISPR-Cas9, le génome des cellules gonadotropes immatures α T3-1 afin d'empêcher la liaison d'ER α sur l'*enhancer* α . Pour cela, j'ai excisé précisément dans ces cellules la séquence nucléotidique de l'ERE dans l'*enhancer* et j'ai caractérisé les modifications des marques épigénétiques qui en découlaient. J'ai ainsi mis en évidence que lorsqu'ER α ne peut plus se fixer sur l'*enhancer* α , ceci conduit à une inactivation complète de l'*enhancer* caractérisée par la fermeture de la chromatine, la reméthylation de l'ensemble des CpG présents dans sa séquence et la forte diminution du dépôt de la marque d'activité, H3K27ac. Associées à ces modifications qui se produisent au niveau de l'*enhancer* α , il se met aussi en place des modifications épigénétiques au niveau du promoteur hypophysaire de *Nr5a1* se caractérisant par une chute du dépôt de la marque d'activité H3K27ac, accompagnée d'une réduction importante de la fixation de l'ARN Polymérase II sur le promoteur (Figure 5 de l'article). Ceci traduit certainement la régulation du promoteur de *Nr5a1* par l'*enhancer* situé à distance qui est rendue possible par le rapprochement topologique observé précédemment avec la technique de 3C. Ainsi, la fixation d'ER α sur l'*enhancer* α conditionne l'expression de *Nr5a1* en induisant un remodelage important des marques épigénétiques de la chromatine à la fois au niveau de l'*enhancer* et du promoteur.

L'ensemble de ces travaux a donc permis de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques qui concourent à l'initiation de l'expression de *Nr5a1* lors de l'émergence du lignage gonadotrope. Ils ont fait l'objet d'une publication originale intitulée « **Identification of a pituitary ER α -activated *enhancer* triggering the expression of *Nr5a1*, the earliest**

gonadotrope lineage-specific transcription factor », Pacini V, et al., dans le journal *Epigenetics & Chromatin* en 2019 et une publication de vulgarisation scientifique, nommée « **ER α orchestre les mécanismes épigénétiques qui déclenchent l'expression du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire** », dans la revue *Médecine/Sciences* en 2020.

Article 1 : « Identification of a pituitary ER α -activated *enhancer* triggering the expression of *Nr5a1*, the earliest gonadotrope lineage-specific transcription factor». Pacini V, *et al. Epigenetics & Chromatin*, 2019

RESEARCH

Open Access



Identification of a pituitary ER α -activated enhancer triggering the expression of *Nr5a1*, the earliest gonadotrope lineage-specific transcription factor

Vincent Pacini, Florence Petit, Bruno Querat, Jean-Noël Laverrière, Joëlle Cohen-Tannoudji and David L'hôte* 

Abstract

Background: Gonadotrope lineage differentiation is a stepwise process taking place during pituitary development. The early step of gonadotrope lineage specification is characterized by the expression of the *Nr5a1* transcription factor, a crucial factor for gonadotrope cell fate determination. Abnormalities affecting *Nr5a1* expression lead to hypogonadotropic hypogonadism and infertility. Although significant knowledge has been gained on the signaling and transcriptional events controlling gonadotrope differentiation, epigenetic mechanisms regulating *Nr5a1* expression during early gonadotrope lineage specification are still poorly understood.

Results: Using ATAC chromatin accessibility analyses on three cell lines recapitulating gradual stages of gonadotrope differentiation and in vivo on developing pituitaries, we demonstrate that a yet undescribed enhancer is transiently recruited during gonadotrope specification. Using CRISPR/Cas9, we show that this enhancer is mandatory for the emergence of *Nr5a1* during gonadotrope specification. Furthermore, we identify a highly conserved estrogen-binding element and demonstrate that the enhancer activation is dependent upon estrogen acting through ER α . Lastly, we provide evidence that binding of ER α is crucial for chromatin remodeling of *Nr5a1* enhancer and promoter, leading to RNA polymerase recruitment and transcription.

Conclusion: This study identifies the earliest regulatory sequence involved in gonadotrope lineage specification and highlights the key epigenetic role played by ER α in this differentiation process.

Keywords: Gonadotrope specification, Enhancer, Epigenetic, *Nr5a1*, Estrogen receptor

Background

Nr5a1 gene (also called *Sf-1* or *Ad4BP*) is a transcription factor (TF) belonging to the nuclear receptor superfamily. In mammals, *Nr5a1* is expressed notably in testes, adrenal glands, ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and anterior pituitary gland where it participates in embryonic cell differentiation and adult function [1]. The anterior pituitary is composed of six hormone-secreting

cell types, i.e., corticotrope, melanotrope, somatotrope, lactotrope, thyrotrope and gonadotrope cells, originating from common precursor stem cells of the Rathke's pouch [2]. Several TFs are known to promote pituitary stem cells differentiation into a specific endocrine lineage: POU1F1 is mandatory for the thyrotrope, somatotrope and lactotrope lineages [3], TBX19 for the corticotrope [4], PAX7 for the melanotrope [5] and *Nr5a1* for the gonadotrope lineage [6]. During gonadotrope cells specification, *Nr5a1* is the earliest specific marker gene known to be expressed [6] initiating transcription of key genes such as *Gnrhr* (GnRH receptor gene) and *Lhb* (β -subunit of the gonadotropin LH gene). As a consequence, mutations

*Correspondence: david.lhote@univ-paris-diderot.fr
Sorbonne Paris Cité, Université Paris-Diderot, CNRS UMR 8251, INSERM U1133, Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Physiologie de l'axe gonadotrope, Paris, France



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

in the human *Nr5a1* gene [7] and *Nr5a1* knockout in mice lead to gonadotrope deficiency [6].

Nr5a1 expression depends on tissue-specific *cis*-regulatory elements. Two main promoters, 1A and 1G, have been characterized. The 1G promoter is the predominantly activated promoter in the pituitary [8]. However, it is not able, alone, to initiate *Nr5a1* expression [9]. Additional distal enhancers are required for tissue-specific transcription. Four specific enhancers have been identified that control expression of *Nr5a1* in the VMH [10], fetal adrenal glands [11], fetal Leydig cells [12] or gonadotrope cells [13]. The gonadotrope enhancer has been suggested to be implicated in *Nr5a1* expression in gonadotropes from mouse embryonic day 13.5 (E13.5) onwards [13]. In a previous work [14], we characterized the epigenetic marks decorating *cis*-regulatory regions of *Nr5a1*. We used a set of three cell lines recapitulating three stages of gonadotrope differentiation. The α T1–1 cells are likely derived from E12.5 common precursor cells from which originate thyrotrope and gonadotrope lineages. These cells do not express *Nr5a1* yet. The α T3–1 cells are likely derived from cells engaged in a gonadotrope cell fate at E13.5 and express some of the gonadotrope-specific genes including *Nr5a1*. The L β T2 cells are likely derived from mature gonadotrope cells and express all the known marker genes [15–17]. We observed that although *Nr5a1* is already expressed in α T3–1 cells, the epigenetic marks on the gonadotrope enhancer indicate that it is repressed, suggesting that it does not regulate *Nr5a1* expression at early steps of gonadotrope specification.

In this work, using functional genomic *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrated that *Nr5a1* expression is triggered by another early activated enhancer at the emergence of gonadotrope lineage. We showed that this enhancer is activated by the estrogen pathway through ER α leading to P300 histone acetyltransferase recruitment. We also demonstrated that ER α protects the enhancer from inhibition by DNA methylation and chromatin compaction. Finally, we showed that the enhancer interacts with the *Nr5a1* pituitary promoter and increases histone acetylation, RNA polymerase recruitment and *Nr5a1* transcription. Activation of this enhancer is thus the earliest known mechanism implicated in gonadotrope cell specification.

Results

Differential chromatin accessibility in *Nr5a1* locus during gonadotrope specification

We performed an assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing analysis (ATAC-seq) in α T1–1, α T3–1 and L β T2 cell lines, allowing the identification of new potential *cis*-regulatory sequences (Fig. 1a and Additional file 1). We observed massive

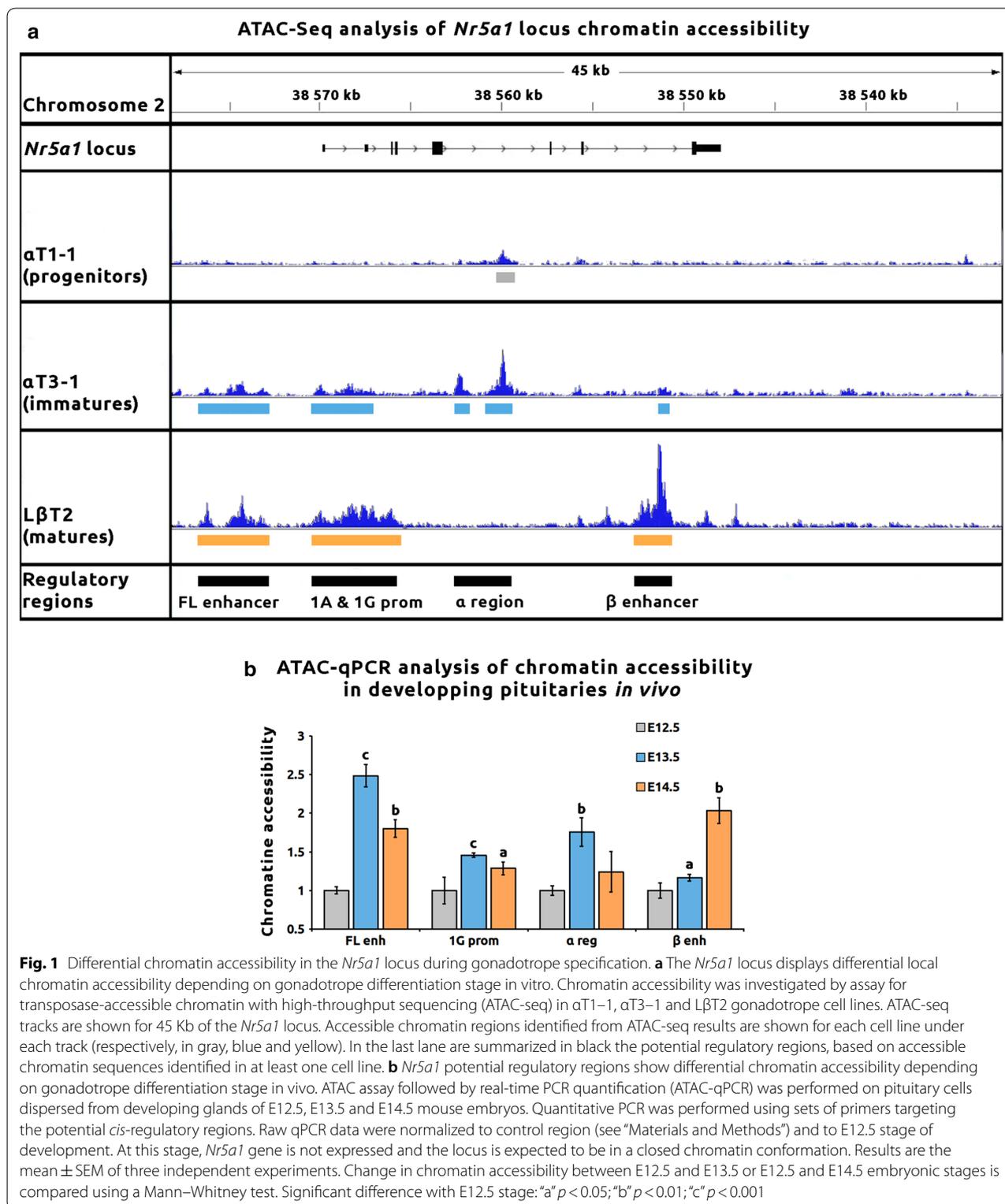
changes in chromatin accessibility in the three cell lines with about 20,000 specific accessible regions per line. Genomic regions associated with genes known to be expressed in the three cell lines, such as *Cga* or *Isl1* promoters, were open in all cell lines. Regions associated with *Gnrhr* promoter were accessible in both α T3–1 and L β T2, whereas those associated with *Lhb* promoter were only found in L β T2 cells (Additional file 1). Chromatin accessibility is thus consistent with the maturation stage of these cellular models.

We then analyzed chromatin accessibility of the *Nr5a1* locus. In α T1–1, consistent with the absence of *Nr5a1* expression, very few genomic regions were accessible in the *Nr5a1* locus. In α T3–1, several open chromatin regions could be observed and among them two had already been described: the 1G promoter, in agreement with *Nr5a1* expression and, more surprisingly, the fetal Leydig enhancer (FL enhancer). This enhancer has been formerly described to be active specifically in the fetal testis [12]. The gonadotrope enhancer (named hereafter β enhancer) showed only very limited chromatin accessibility in α T3–1 cells, in agreement with our previous observations [14]. The chromatin was also accessible for a previously undescribed region encompassing two very close peaks in intron 4 (peak-1: mm9 chr2:38,559,896–38,560,286 and peak-2: mm9 chr2:38,562,187–38,562,583), named hereafter the α region. This region exhibited only limited chromatin accessibility in α T1–1 cells. In L β T2 cells, the 1G promoter as well as the FL and β enhancers all showed accessible chromatin conformation. In contrast, the chromatin of the α region was no more accessible.

These results strongly suggested that the *Nr5a1* locus displays dynamic chromatin accessibility during gonadotrope lineage differentiation. In order to investigate whether the same dynamics could be observed *in vivo*, we set up an ATAC assay followed by qPCR on developing pituitaries of mouse embryos (Fig. 1b). We observed that the 1G promoter was significantly open at E13.5 and E14.5 compared to E12.5, in agreement with the *Nr5a1* expression dynamics during mouse pituitary development [6]. Chromatin at the α region was strongly and transiently accessible at E13.5. While chromatin at the β enhancer displayed a very limited accessibility at E13.5, it was fully open at E14.5. Finally, the FL enhancer was open from E13.5 onwards. Differential chromatin accessibility in *Nr5a1* locus during gonadotrope specification was thus validated in developing embryos *in vivo*.

Discovery of an undescribed early enhancer in *Nr5a1* locus

In order to further characterize regions with chromatin accessibility, we studied in the three cell lines the deposition of H3K4me3, H3K4me1 and H3K27ac histone



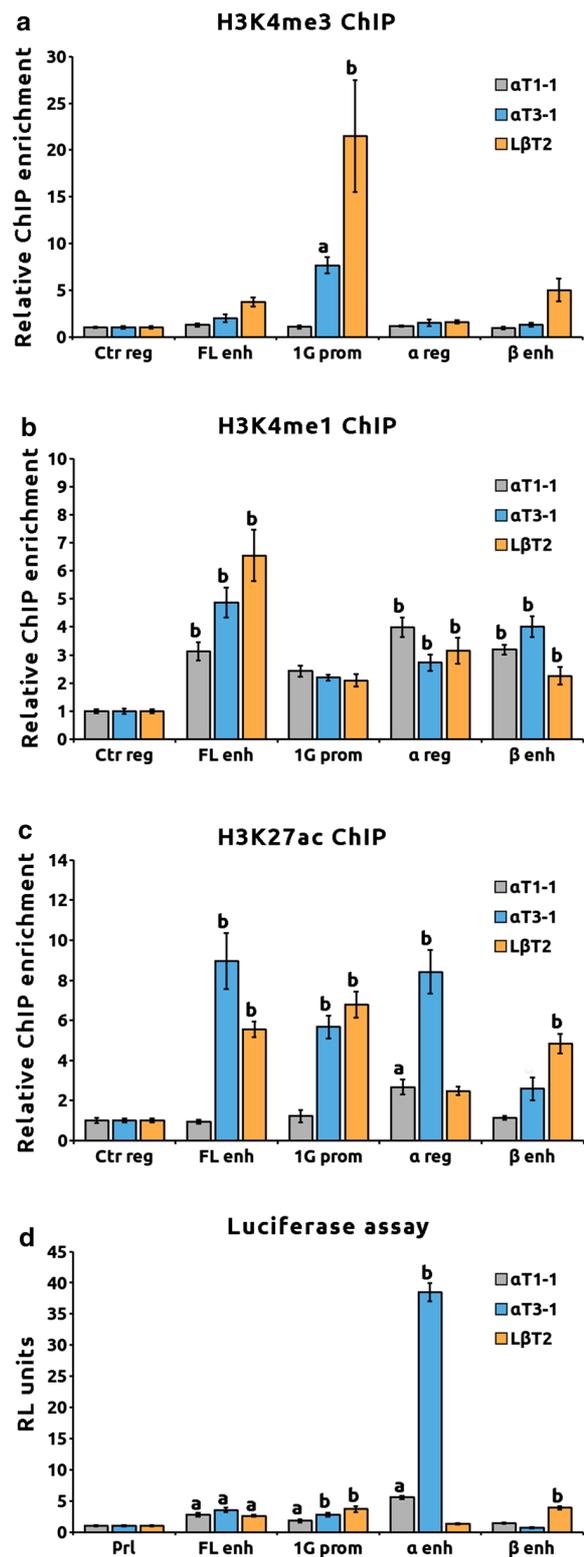
marks, specific for promoters, enhancers and active elements, respectively (Fig. 2a–c). Only the 1G promoter was significantly enriched with H3K4me3 in α T3-1 and

L β T2 cells (Fig. 2a). All other regions had significant H3K4me1 enrichment at these three stages of gonadotrope maturation, indicating that they all are potential

Fig. 2 Discovery of an undescribed early enhancer of *Nr5a1* gene. **a, b** and **c** *Nr5a1*-accessible chromatin regions harbor differential epigenetic marks of active enhancers depending on gonadotrope stage of differentiation. Epigenetic modifications of histone H3 associated with ATAC-seq open regions were investigated using chromatin immunoprecipitation assays in α T1-1, α T3-1 and L β T2 cell lines. Analyzed marks were lysine 4 tri- and monomethylation H3K4me3 (**a**) and H4K4me1 (**b**), specific of promoters and enhancers, respectively, and lysine 27 acetylation H3K27ac (**c**), enriched on active *cis*-regulatory sequences. Quantitative PCR was performed using sets of primers targeting ATAC-seq open regions. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests was performed independently for each cell line and each histone modification. Results are the mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference with the control region: “a” $p < 0.05$; “b” $p < 0.01$. **d** *Nr5a1*-accessible chromatin regions display differential *cis*-regulatory activity depending on gonadotrope differentiation stage. α T1-1, α T3-1 and L β T2 cells were transiently transfected with the potential *cis*-regulatory regions cloned in a pGL3b Luciferase reporter system containing a minimal prolactin promoter (Pluc-Prl). Relative luciferase activity was measured as indicated in “Materials and Methods.” ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests was performed independently for each cell line. Results are normalized to control Pluc-Prl plasmid and are the mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference with the control construct: “a” $p < 0.05$; “b” $p < 0.01$

enhancers (Fig. 2b). Concerning deposition of the active chromatin mark (Fig. 2c), the 1G promoter and FL enhancer were enriched in H3K27ac only in α T3-1 and L β T2 cells. While the β enhancer was decorated with H3K27ac only in L β T2, the α potential enhancer was significantly decorated with H3K27ac in α T1-1 and α T3-1 cells (Fig. 2c, fold enrichment of 2.6 ± 0.4 , $p < 0.05$ and 8.4 ± 1.0 , $p < 0.01$, respectively).

Potential *cis*-regulatory activity was then studied in luciferase reporter system (Fig. 2d). We observed that the FL enhancer and 1G promoter were active in the three cell lines. A significant *cis*-regulatory activity of the α enhancer peak-2 could be already observed in α T1-1 that was strongly increased in α T3-1 (fold induction of 5.6 ± 0.8 and 38.5 ± 1.4 over control Pluc-Prl, $p < 0.01$ in α T1-1 and α T3-1, respectively) but lost in L β T2 cells. As peak-1 did not show any regulatory activity in the α T3-1 cell line (Additional file 2A), subsequent experiments were performed on the peak-2 only and α enhancer will thereafter refer to this peak. The β enhancer displayed a significant *cis*-regulatory activity only in L β T2 cells (fold induction of 3.8 ± 0.2 , $p < 0.01$). Altogether these results suggest that: (i) the β enhancer is active only during the terminal maturation stage; (ii) the FL enhancer might also be recruited



in gonadotropes; (iii) the α region is a genuine gonadotrope enhancer potentially activated in precursor and immature cells.

The α enhancer regulates *Nr5a1* expression specifically in immature gonadotropes

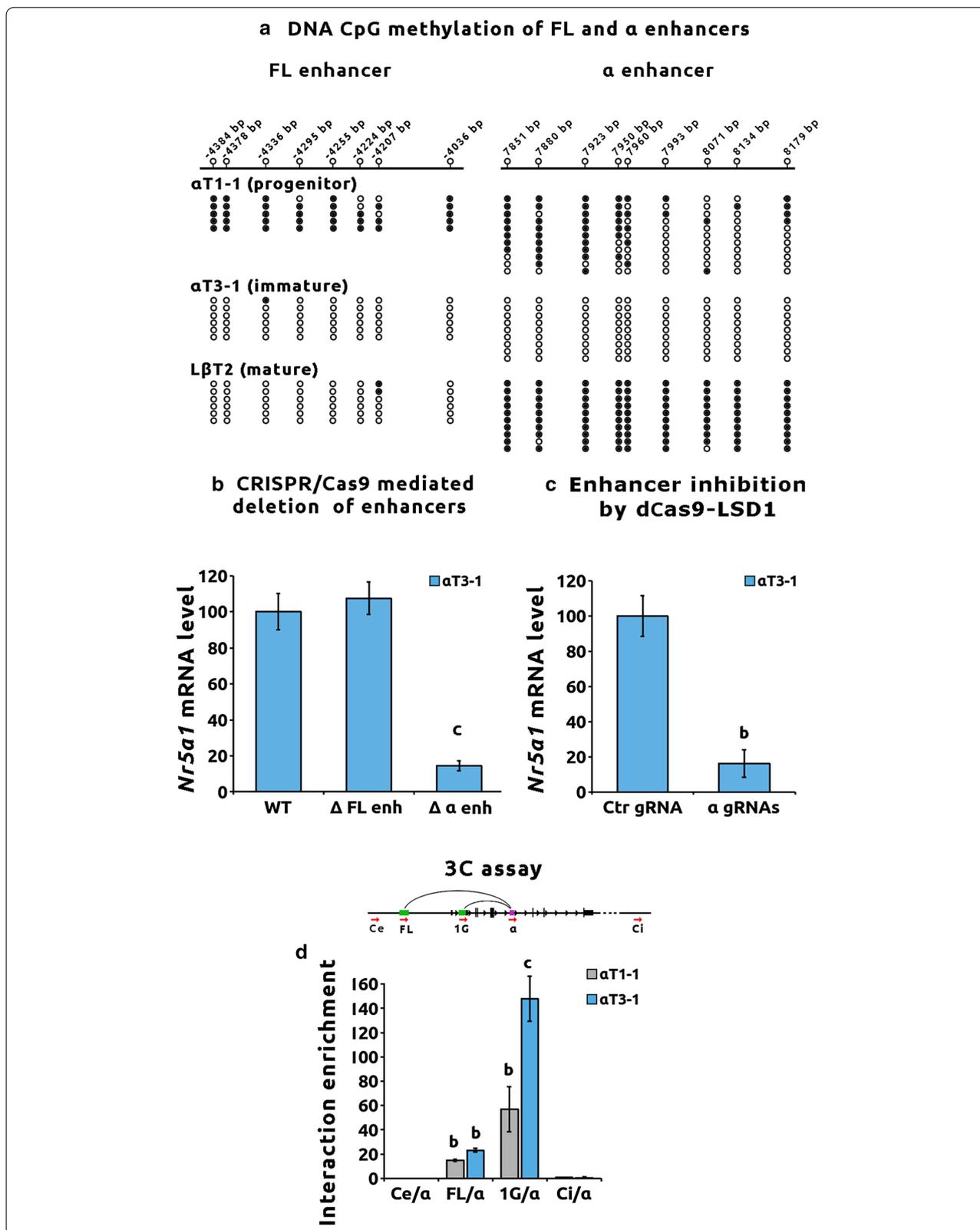
CpGs DNA methylation of the active enhancers was investigated by bisulfite DNA sequencing. As shown in Fig. 3a, CpGs of the α enhancer were mostly hypermethylated in progenitors, fully demethylated in immature and methylated again in mature cells. The FL enhancer was hypermethylated in α T1–1 and unmethylated in α T3–1 and L β T2 cells. Thus, both DNA methylation and histone decoration show that the FL enhancer is totally inactive in progenitors and active in immature and mature cells. In contrast, the α enhancer is in a bivalent state in progenitors, exhibiting both active and inactive marks, active in immature and totally silent in mature gonadotropes.

To further confirm the regulatory role of the α enhancer in *Nr5a1* expression, the peak-2 genomic sequence was excised from α T3–1 genome by CRISPR/Cas9. Excision was also performed for the FL enhancer. Deletion of the FL enhancer did not alter *Nr5a1* expression in α T3–1, whereas deletion of α enhancer sequence led to a strong reduction in expression as revealed by a 85% decrease in *Nr5a1* mRNA level (Fig. 3b, $p < 0.001$). This drastic reduction was observed in three independent

clones for two independent gRNA couples, ruling out potential gRNA off target effects. (The genomic sequences of deleted clones along with gRNAs position are shown in Additional file 2B.) In order to inactivate this enhancer without altering the DNA sequence, we targeted dCas9–LSD1, a lysine-specific histone demethylase to the α enhancer. In α T3–1 cells, this led to an 80% decrease in *Nr5a1* mRNA level as compared with control gRNA (Fig. 3c, $p < 0.01$). Decommissioning the α enhancer in L β T2 cells did not impair *Nr5a1* expression, while targeting LSD1 to the β enhancer strongly reduced it (fold decrease of about 90%, Additional file 3A). The transient α enhancer activation is thus mandatory for *Nr5a1* expression specifically in immature gonadotropes. Chromatin interaction between the α enhancer and 1G promoter was investigated in α T1–1 and α T3–1 using quantitative chromatin conformation capture (3C) assay (Fig. 3d). We also tested potential interactions with control regions, external (Ce) and internal (Ci) to the *Nr5a1* locus as well as the FL enhancer. No interaction between the α enhancer and the upstream region (Ce/ α) could be detected in the two cell lines. In contrast, in α T3–1 cells (and to a lesser extent in the α T1–1), the α enhancer interacts significantly with the 1G promoter as well as with the FL enhancer (Fig. 3d).

(See figure on next page.)

Fig. 3 The α enhancer regulates *Nr5a1* expression specifically in immature gonadotropes. **a** The α enhancer exhibits different DNA CpG methylation status according to gonadotrope differentiation stage. Genomic DNA of α T1–1, α T3–1 and L β T2 cells was extracted and bisulfited. The FL enhancer and α enhancer-bisulfited sequences were amplified and cloned. A minimum of five clones per cell line was sequenced. Top: Schematic representation of enhancer sequences with location of CpGs (open-circle lollipop). Numbering is relative to *Nr5a1* 1A promoter TSS. The state of CpG methylation for each cell line, methylated (black circles) or unmethylated (open circles), is indicated below. **b** The regulation of *Nr5a1* expression is dependent on the α enhancer sequence in immature α T3–1 cells. Deletion of genomic sequence of the FL and α enhancers was carried out in α T3–1 cells using CRISPR/Cas9 and two independent specific guide RNA (gRNA) couples flanking each enhancer sequence: a gRNA1–gRNA3 or a gRNA2–gRNA4 for the α enhancer and FL gRNA1–gRNA3 or FL gRNA2–gRNA4 for the FL enhancer as described in Additional file 7. Untargeting control gRNA was used as control. For each gRNA couples, three independent homozygous clones were tested for *Nr5a1* expression by RT-qPCR. *Nr5a1* expression level was normalized to *Gapdh*. Data are the normalized mean \pm SEM of six independent experiments. WT and Δ FL enh α T3–1 or Δ α enh α T3–1 clones were compared with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests. Significant difference with WT: "c" $p < 0.001$. **c** The α enhancer is a functional enhancer of *Nr5a1* in immature α T3–1 cells. The α enhancer was decommissioned in α T3–1 cells using CRISPR/dCas9 fused with the lysine-specific histone demethylase LSD1 coding sequence (dCas9–LSD1). The dCas9–LSD1 was targeted to the α enhancer genomic sequence using a gRNA1–gRNA3 or a gRNA2–gRNA4 gRNA couples. Untargeting control gRNA (Ctr gRNA) was used as control. The 25% highly transfected cells were retrieved using cytometry cell sorting and tested for *Nr5a1* expression by RT-qPCR. *Nr5a1* expression level was normalized to *Gapdh*. Data are the normalized mean \pm SEM of three independent experiments and are compared to control untargeting gRNA using Student's *t* test "b" $p < 0.01$. **d** The α enhancer interacts with *Nr5a1* pituitary promoter in progenitor and immature cells. Top: Quantitative chromatin conformation capture (3C) assay was carried out in α T1–1 and α T3–1 cells. Chimeric DNA fragments were detected using a fixed forward primer targeting the α enhancer and several forward primers targeting regions upstream, inside or downstream from the 1G pituitary promoter sequence as shown in the schematic diagram of *Nr5a1* structure. Primers positions are indicated with red arrows for Ce (external to locus control region), FL (fetal Leydig enhancer), 1G (1G promoter), α (α enhancer) and Ci (internal to locus control region). Exons are indicated as dark bars, regulatory regions as green bars and α enhancer as a purple bar. Numbering is relative to 1A promoter TSS. Bottom: Histograms showing qPCR measurements of chimeric fragments in 3C library. Raw qPCR data were normalized to input and to Ci/ α chimeric DNA used as a control of non-specific ligation events. RP23 225F7 bacterial artificial chromosome (BAC) was used to create template enabling quantitative measurement of chimeric regions in the 3C library. Data are the mean \pm SEM of four independent experiments and were analyzed with ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests. Significant difference with Ci/ α : "b" $p < 0.01$; "c" $p < 0.001$, nd: not detected



ER α controls *cis*-regulatory activity of the α enhancer

In order to understand the mechanisms regulating α enhancer activity, genomic sequence conservation of the α enhancer peak-2 was analyzed across mammals (Fig. 4a). A 65-bp core sequence (mm9 chr2:38,560,050–38,560,114) is conserved including a 13-bp stretch showing more than 60% of conservation. According to the *cis*BP online library [18], this element corresponds to a perfect ERE motif. No other conserved binding site could be identified in the rest of the core sequence (Additional file 2C).

In order to test the involvement of this 65-bp core sequence in the α enhancer *cis*-regulatory activity, truncated sequences were tested by luciferase reporter assay in α T3–1 cells maintained in complete steroid-containing medium (Fig. 4b). The full-length α enhancer construct (Pluc– α enh) displayed a significant *cis*-regulatory activity as compared to the minimal prolactin promoter (Pluc–Prl) used as control. The 65-bp core sequence (Pluc– α enh +65) showed similar activity as Pluc– α enh. Furthermore, deletion of the 65-bp core sequence (Pluc– α enh Δ 65) or mutation of the potential ERE motif (Pluc– α enh MutERE) completely abolished *cis*-regulatory activity in α T3–1 cells. This demonstrates that the 65-bp core conserved sequence is sufficient alone to drive α enhancer activity and that the ERE motif is crucial for this activity.

Both estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) bind to ERE motif. *Esr1* and *Esr2* mRNAs were quantified by RT-qPCR (Fig. 4c). While *Esr2* transcripts were undetectable, *Esr1* was expressed in α T1–1 and α T3–1 cells, with a fivefold higher expression level in α T3–1 cells (Fig. 4c, $p < 0.01$). In mature L β T2 cells, *Esr1* mRNA could hardly be detected.

ChIP using an anti-ER α antibody was then performed in α T1–1 and α T3–1 cells. ER α was strongly enriched on the α enhancer as compared to the control region in α T3–1 cells (Fig. 4d, $p < 0.001$). Binding of ER α to the α enhancer was also observed to a lesser extent in α T1–1 cells (Additional file 4A, $p < 0.01$).

To further analyze the role of ER α in the regulation of α enhancer activity, *Esr1* expression was knocked down using *Esr1* SiRNA. Efficiency in ER α decrease was validated by western blot (Additional file 5A). Specific knockdown of ER α abolished α enhancer *cis*-regulatory activity in α T3–1 cells (Fig. 4e, $p < 0.001$). A significant decrease in α enhancer activity was also observed in α T1–1 cells (Additional file 4C).

In order to test ligand dependency, α enhancer activity was measured in the presence of 17 β -estradiol (E2) or the widely used antagonist ICI 182,780 in the α T3–1 cells. While E2 dose-dependently activated α enhancer *cis*-regulatory activity, ER inhibition led to a dose-dependent

(See figure on next page.)

Fig. 4 ER α controls the *cis*-regulatory activity of the α enhancer. **a** A 65-bp core sequence of the α enhancer is conserved across mammalian genomes. The α enhancer genomic sequences of 31 mammalian species were retrieved on Ensembl Web site and aligned using Clustal Omega software. A 65-bp core sequence displays clear conservation among the different species. In this core sequence, a perfect match with the canonical ERE-binding site was observed (red bar and ERE-binding motif). **b** The ERE-binding site in the 65-bp core sequence is essential for α enhancer *cis*-regulatory activity in immature α T3–1 cells. α T3–1 cells were transiently transfected in complete steroid-containing culture medium with Pluc constructs containing either a minimal prolactin promoter (Pluc–Prl) used as control, a full-length α enhancer (Pluc– α enh), a truncated α enhancer (Pluc– α enh Δ 65, harboring a deletion of the 65-bp core sequence), a reduced α enhancer (Pluc– α enh +65, containing only the 65-bp core sequence) or a mutated α enhancer (Pluc– α enh MutERE with the following mutation in the ERE-binding site: GATCAATGTGATC). Prl minimal promoter is represented in dark followed by luciferase coding sequence shown in green, α enhancer is represented in blue, containing the 65-bp core sequence in orange, and the ERE-binding site in yellow. ERE mutation is indicated with asterisks. Relative luciferase activity was measured as indicated in “Materials and Methods.” Results were normalized to Pluc–Prl used as control and are the mean \pm SEM of six independent experiments. Comparisons with control were performed with ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests. Significant difference with Pluc–Prl control: “c” $p < 0.001$. **c** *Era* but not *Er β* is expressed in immature α T3–1 cells. Total RNA from α T1–1, α T3–1 and L β T2 cells was extracted and reverse transcribed. The mRNA levels of *Era* and *Er β* were quantified as indicated in “Materials and Methods.” Results are normalized to *Gapdh* and are the mean \pm SEM of four independent experiments. ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc comparisons test was performed to compare *Era* expression in the different cell lines. Significant difference: “a” $p < 0.05$ and “b” $p < 0.01$. Nd: not detected. **d** Endogenous ER α binds to the α enhancer chromatin in immature α T3–1 cells. ER α binding on α enhancer chromatin was investigated using ChIP assays in the α T3–1 cell line using the anti-estrogen receptor alpha ChIP-grade antibody (abcam ab32063). Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer sequence (α enh). Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region (Ctr region). Results are the mean \pm SEM of four independent experiments. Significant difference with the control region using Student’s *t*-test: “c” $p < 0.001$. **e** The *cis*-regulatory activity of α enhancer is strictly dependent on *Era* expression level. α T3–1 cells were transiently co-transfected with control (Pluc–Prl) or full-length α enhancer (Pluc– α enh) constructs and with scramble or *Era* SiRNA. Relative luciferase activity was measured as indicated in “Materials and Methods.” Results were normalized to control Pluc–Prl plasmid and are the mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference with the scramble SiRNA using Student’s *t* test “c” $p < 0.001$. **f** ER α agonist and antagonist modulate α enhancer *cis*-regulatory activity. α T3–1 cells were transiently transfected with control (Pluc–Prl) or full-length α enhancer (Pluc– α enh) constructs. Transfected cells were treated with either vehicle, E2 or ICI 182,780 at the indicated concentrations. Relative luciferase activity was measured as indicated in “Materials and Methods.” Results were normalized for control Pluc–Prl and are the mean \pm SEM of six independent experiments. ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests was performed to compare drugs at different concentrations against vehicle. Significant difference with the vehicle: “c” $p < 0.001$

repression (Fig. 4f). A similar repression could be observed using the ER α -specific antagonist, MPP dihydrochloride (Additional file 5B).

To confirm α enhancer dependency to both ER α and E2, activities of the WT- and ERE-mutated α enhancers were assessed in the presence of E2 combined with ER α over-expression in L β T2 cells. We observed that α enhancer activity can be significantly induced by ER α over-expression alone (fold induction compared to basal of 19.7 ± 3.5 , $p < 0.001$, Additional file 3B) and further increased by ER α over-expression combined with E2 treatment (fold induction compared to basal of 65.1 ± 5.4 , $p < 0.001$, Additional file 3B). Mutation of the ERE abolished ER α and E2 effects on α enhancer *cis*-regulatory activity.

In order to investigate whether ER α is sufficient to activate the endogenous α enhancer in mature gonadotrope cells, ER α was over-expressed in L β T2 cells and the α enhancer chromatin accessibility was assessed by ATAC-qPCR. We observed that over-expression of ER α is sufficient to significantly increase α enhancer chromatin accessibility in mature gonadotropes (fold increase in chromatin accessibility of 2.2 ± 0.4 , $p < 0.01$ Additional file 3C).

These results altogether demonstrate that the α enhancer is active only in immature gonadotrope cells and that this activity is regulated by ER α and E2.

ER α controls *Nr5a1* expression through epigenetic regulation of the α enhancer and 1G promoter

To specifically inhibit ER α binding to the α enhancer, the ERE motif of α enhancer genomic sequence was excised using CRISPR/Cas9 in immature gonadotropes. Two α T3-1 clones (Δ ERE) bearing homozygous deletion of this ERE were retrieved. As expected, the deletion encompassed the ERE plus four additional bases at each side (Fig. 5a). ChIP assay showed that ER α enrichment on α enhancer was dramatically decreased in Δ ERE clones as compared to WT (99% decrease $p < 0.001$) (Fig. 5b).

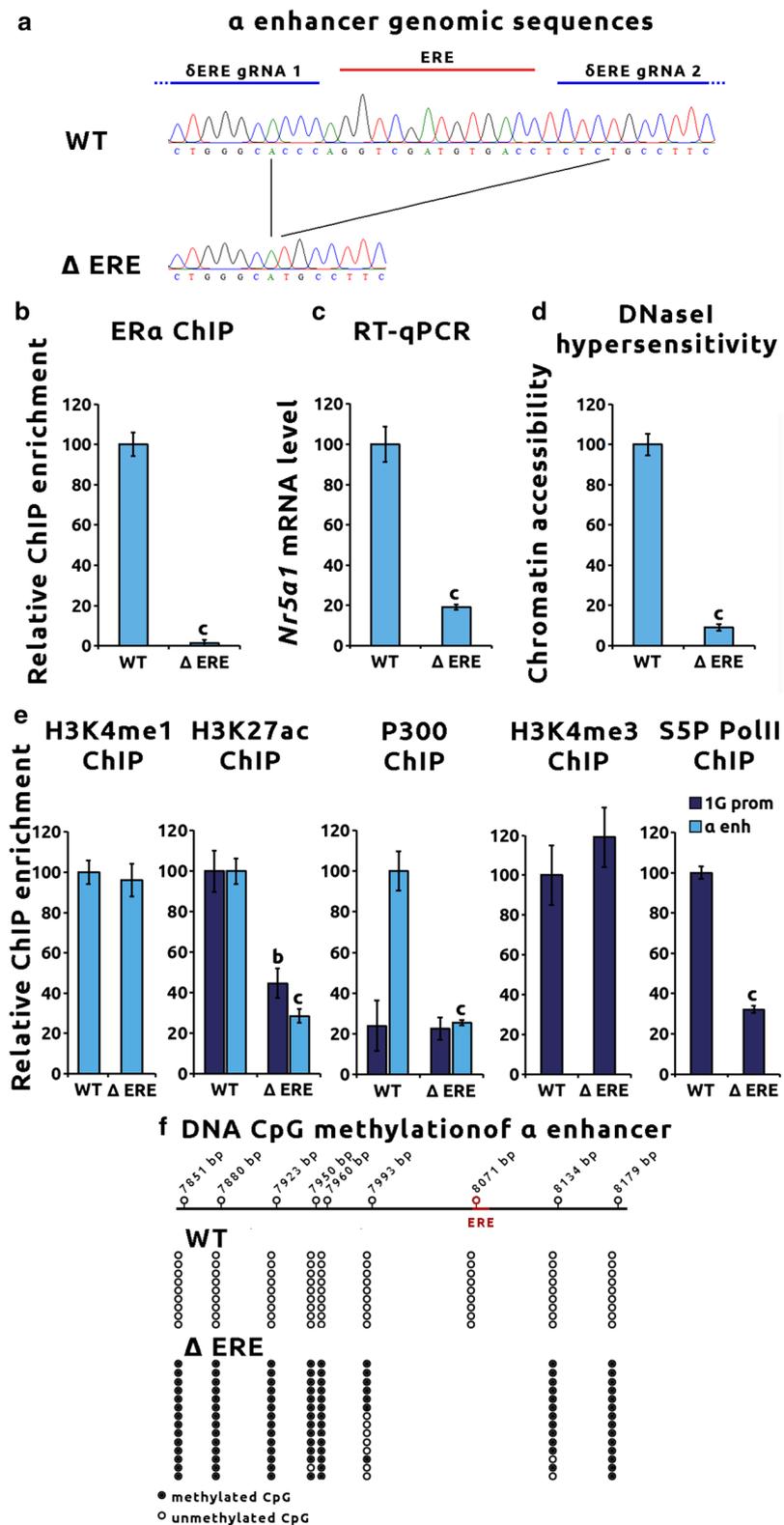
Nr5a1 expression level was then quantified in Δ ERE clones. Compared to WT clones, *Nr5a1* expression was decreased by 85% in Δ ERE clones (Fig. 5c, $p < 0.001$).

To further characterize α enhancer regulation by ER α , epigenetic remodeling at the α enhancer and 1G promoter was then investigated in Δ ERE clones. DNase I hypersensitivity assay revealed that excision of ERE-binding site led to a 90% decrease in α enhancer chromatin accessibility (Fig. 5d, $p < 0.001$). Comparison of histone mark decoration of α enhancer between Δ ERE and WT clones revealed that deletion of ERE did not impact H3K4me1 deposition on the α enhancer (Fig. 5e). However, a 75% drop in H3K27ac enrichment could be observed (Fig. 5e, $p < 0.001$).

Binding of the P300 histone acetyltransferase to the α enhancer was then investigated by ChIP using anti-P300

(See figure on next page.)

Fig. 5 ER α controls *Nr5a1* expression through epigenetic regulation of the α enhancer. **a** Deletion of the α enhancer ERE-binding site using CRISPR/Cas9 in immature α T3-1 cells. Deletion of ERE genomic sequence in α enhancer was carried out in α T3-1 cells using CRISPR/Cas9 and a couple of specific gRNA flanking the ERE sequence. Untargeting gRNA was used as control. Two independent homozygous clones for both deletion and for control gRNA were sequenced. The genomic sequences of WT and deleted ERE (Δ ERE) α T3-1 clones are shown along with the ERE motif and the δ ERE-gRNA positions. **b** Deletion of the α enhancer ERE prevents ER α binding to the enhancer chromatin in immature α T3-1 cells. ER α binding on α enhancer chromatin was investigated using ChIP assays in WT and Δ ERE α T3-1 clones. Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer genomic sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference with the control region was analyzed using Student's *t*-test: "*c*" $p < 0.001$. **c** An intact ER α -binding site in the α enhancer is essential for *Nr5a1* expression in immature α T3-1 cells. *Nr5a1* expression in WT and Δ ERE α T3-1 cells was measured by RT-qPCR. *Nr5a1* expression level was normalized to *Gapdh*. Data are the normalized mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference with the WT using Student's *t*-test: "*c*" $p < 0.001$. **d** Abolition of the ER α binding site in α enhancer leads to a strong reduction in the α enhancer chromatin accessibility in immature α T3-1 cells. The α enhancer chromatin accessibility was investigated using DNase I hypersensitivity (DNase I HS) assay in WT and Δ ERE α T3-1 clones. Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer genomic sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of four independent experiments. Significant difference with the WT using Student's *t*-test: "*c*" $p < 0.001$. **e** Abolition of the ER α -binding site in the α enhancer prevents active chromatin marks deposition on the α enhancer and 1G promoter in immature α T3-1 cells. Monomethylation of Lys4 (H3K4me1), acetylation of Lys27 on histone H3 (H3K27ac) and trimethylation of Lys4 (H3K4me3) epigenetic modifications as well as binding of P300 and serine 5-phosphorylated RNA polymerase II (SSP Pol II) to the α enhancer and/or 1G promoter sequences were studied using ChIP assays in WT and Δ ERE α T3-1 clones. Quantitative PCR was performed using sets of primers targeting the α enhancer or 1G promoter sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results are expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference between WT and Δ ERE α T3-1 clones for each mark and each *cis*-regulatory element was studied using Student's *t*-test: "*b*" $p < 0.01$; "*c*" $p < 0.001$. **f** Abolition of the ER α -binding site in the α enhancer leads to CpG hypermethylation of the α enhancer chromatin in immature α T3-1 cells. Genomic DNA of WT and Δ ERE α T3-1 clones was extracted and bisulfited. The α enhancer-bisulfited sequences were amplified and cloned. A minimum of nine clones per cell line was sequenced. Top: schematic representation of the α enhancer sequence with location of CpG (open-circle lollipops) and of the ERE site. Below is indicated the state of CpG methylation for each cell line, methylated (black circles) or unmethylated (open circles)



antibody. P300 was significantly enriched on the α enhancer in α T3–1 and to a lesser extent in α T1–1 cells (Additional file 4B, $p < 0.01$). Deletion of ERE led to an 80% decrease in P300 recruitment in α T3–1 cells (Fig. 5e, $p < 0.001$). CpGs DNA methylation was analyzed in Δ ERE compared with WT clones (Fig. 5g). Inhibition of ER α binding led to a hypermethylation of the α enhancer in immature gonadotropes.

Analysis of the 1G promoter epigenetics revealed that α enhancer repression did not affect H3K4me3 mark deposition. It, however, decreased H3K27ac enrichment on the 1G promoter (60% decrease $p < 0.01$, Fig. 5e) without decreasing P300 recruitment. This decrease was associated with a decrease in serine 5-phosphorylated RNA polymerase II recruitment to the TSS (60% decrease $p < 0.001$, Fig. 5e).

Altogether, these results demonstrate that ER α binding to the α enhancer leads to epigenetic activation of the α enhancer and 1G promoter leading to *Nr5a1* expression in immature gonadotropes.

Discussion

Gonadotrope differentiation is a stepwise process taking place during pituitary development. Gonadotrope lineage is characterized by the expression of *Nr5a1*, a mandatory TF for gonadotrope cell identity and maturation [6]. However, the molecular mechanisms triggering *Nr5a1* expression are still poorly understood. In the current study, we have analyzed the epigenetic mechanisms implicated in this process. Using three cell lines recapitulating different stages of gonadotrope differentiation and combining chromatin accessibility analyses with studies of epigenetic mark deposition and *cis*-regulatory activity, we re-evaluated the implication of previously described *Nr5a1* *cis*-regulatory sequences and characterized a yet unidentified enhancer element that initiates *Nr5a1* expression at the earliest step of gonadotrope specification.

Nr5a1 expression has been suggested to be under the control of the 1G promoter and β enhancer in differentiating gonadotropes [8, 13]. Here, we confirmed that these two regulatory sequences are indeed activated in mature L β T2 cells. However, we showed that although the *Nr5a1* 1G promoter is already active in immature gonadotropes, this is not true for the β enhancer that does not display any active chromatin marks or *cis*-regulatory activity at this differentiation stage. This demonstrates that, in immature gonadotropes, molecular mechanisms necessary for β enhancer activity are not yet at work. The β enhancer is thus not the earliest enhancer triggering *Nr5a1* expression during gonadotrope specification.

Previous experiments performed by Stallings et al. [9] demonstrated that genomic fragments encompassing the

1G promoter are not sufficient to induce *Nr5a1* expression *in vivo* in the pituitary. We thus decided to analyze chromatin accessibility in the *Nr5a1* locus using our cellular models of gonadotrope differentiation to search for new *cis*-regulatory elements. Among the different potential *cis*-regulatory elements showing chromatin accessibility, one enhancer had already been characterized as a regulator of *Nr5a1* expression in fetal Leydig cells [12]. We showed that this FL enhancer is active in immature and mature cells and repressed in progenitors. It, however, cannot be implicated in the initiation of *Nr5a1* expression as it is located inside the genomic fragments that were tested as negative by Stallings et al. [9]. Interestingly, we identified a previously undescribed enhancer, the α enhancer, with an intriguing activation pattern: It is transiently and specifically activated at the immature stage *in vitro*. In order to investigate the activation of the α region *in vivo*, we studied chromatin accessibility in the *Nr5a1* locus during mouse pituitary development. Interestingly, the chromatin at the α region was only transiently accessible at E13.5 corresponding to gonadotrope cell emergence and initiation of *Nr5a1* expression. Moreover, this α enhancer displays *bonafide* active enhancer epigenetic mark decorations, with P300 recruitment, H3K27ac deposition and demethylated CpGs. Using both deletion and functional assays, we demonstrated that this enhancer is mandatory for *Nr5a1* expression in immature gonadotropes, contrary to the FL and β enhancers. Altogether, these data demonstrate that the α enhancer is the earliest activated *cis*-regulatory sequence of *Nr5a1* gene, and as such, the earliest *cis*-regulatory sequence specifically activated during gonadotrope specification.

According to our work, *Nr5a1* expression would be dynamically regulated by the sequential recruitment of two enhancers, the α enhancer during the early steps of lineage specification and then the β enhancer in mature gonadotropes. The FL enhancer, which is active during both stages, might act as a relay during this process. Supporting this hypothesis, a recent work has demonstrated the involvement of such transiently activated enhancers during the motor neuron differentiation process [19].

Analysis of the sequence conservation of the α enhancer in mammals allowed us to identify an almost perfectly conserved ERE motif. We demonstrated that ER α binds to this ERE and that regulation of the α enhancer activity is estrogen dependent. During mouse embryogenesis, *Esr1* is expressed in the developing pituitary from E12.5 onwards [data from GenePaint.org (image C1253.3.4.B) and Additional file 6A]. However, fetal circulating estrogens are believed to be inactive. Yet, active estrogens can be locally produced either by desulfonation of circulating estrogens sulfate by the steroid sulfatase (STS) enzyme or by aromatization of circulating androgens by aromatase.

Genes encoding both enzymes are expressed in mouse and rat adult pituitaries [20–22]. Moreover, *Sts* transcripts (but not of the aromatase coding gene *Cyp19a1*) are expressed in progenitor and immature gonadotrope cells (Additional file 6B), supporting the idea that differentiating gonadotropes could locally produce the estrogens needed for α enhancer activation.

Interestingly, *Nr5a1* expression has been shown to be regulated by estrogens in pituitary and testis [23, 24]. In addition, pituitary *Nr5a1* expression can be affected by prenatal exposure to estrogenic endocrine-disrupting chemicals [25]. However, no functional ERE motif was found in *Nr5a1* promoters. The α enhancer is thus a *bonafide* candidate to mediate estrogen regulation of *Nr5a1* expression though ER α recruitment.

Here, by precisely deleting ERE motif from the α enhancer genomic sequence using CRISPR/Cas9 strategy, we successfully inhibited ER α binding. We observed that ER α binding is mandatory for *Nr5a1* expression in immature gonadotropes. We further demonstrated that ER α binding initiates epigenetic remodeling including P300 recruitment and subsequent H3K27ac deposition, maintaining both an open chromatin state and CpGs hypomethylation. Interestingly, we observed that ER α binding to the α enhancer also remotely regulates the 1G promoter activity. Data obtained using quantitative 3C assay strongly suggest that promoter activation is mediated in part by chromatin looping. Recent evidence obtained from studies in several cellular models [26–28] indicates that ER α may regulate gene expression mainly through enhancer activation. It has also been shown in breast cancer cells that ER α binding to enhancers increases P300 recruitment [29] and decreases DNA CpG methylation [30]. Our data demonstrate that ER α -dependent epigenetic regulation is also crucial during the earliest step of gonadotrope lineage specification.

Interestingly, we observed that ER α and P300 already bind to the α enhancer in progenitor cells and that CpGs around and inside the ERE motif remain hypomethylated. This suggests that ER α binding to the α enhancer in progenitors protects the ERE from de novo CpG methylation and allows enhancer pre-activation by increasing H3K27ac deposition. Very recently, ER α has been shown to be implicated in a biphasic recruitment of P300 on enhancers [31]: Binding of ER α first leads to P300 recruitment and histone acetylation, promoting initial enhancer pre-activation; then, ER α co-activators are recruited to reinforce P300 binding, leading to enhancer maturation and full activation.

Over-expression of ER α combined to E2 treatment in the progenitor cell line is not sufficient to induce *Nr5a1* expression (data not shown), suggesting that

ER α is not able to activate the endogenous α enhancer in a repressed chromatin environment. This is consistent with several works, showing that ER α requires pioneer TFs to bind to nucleosome-masked ERE sites [32]. Thus, these mandatory pioneer factors might not yet be expressed in the progenitor cells. Based on our study, we can hypothesize that the α enhancer is in a bivalent state in progenitor gonadotropes, silent yet prone to be activated by recruitment of ER α co-activators (Fig. 6). By contrast, over-expression of ER α is sufficient to re-activate the α enhancer in the mature gonadotropes. This suggests that in mature gonadotropes, the absence of ER α expression prevents α enhancer activation although the required co-activators or pioneer factors remain expressed at this stage. Moreover, as ER α is known to be expressed in adult gonadotropes, it would suggest that α enhancer might be recruited again in adulthood to regulate dynamically *Nr5a1* expression at important stages of reproductive life.

Molecular mechanisms implicated in α enhancer activation and inhibition are in current investigation and should lead to the identification of new actors of gonadotrope lineage specification and function.

Conclusions

Gonadotrope cell specification is still not well understood, and although key TFs and signaling pathways have been identified, the molecular events implicated in the very early steps of this lineage commitment remain elusive. Deciphering the dynamic of the regulatory enhancer network during gonadotrope specification should significantly improve the understanding of this process. This knowledge is critical for efficient reprogramming of stem cells into mature gonadotropes that would have important therapeutic applications.

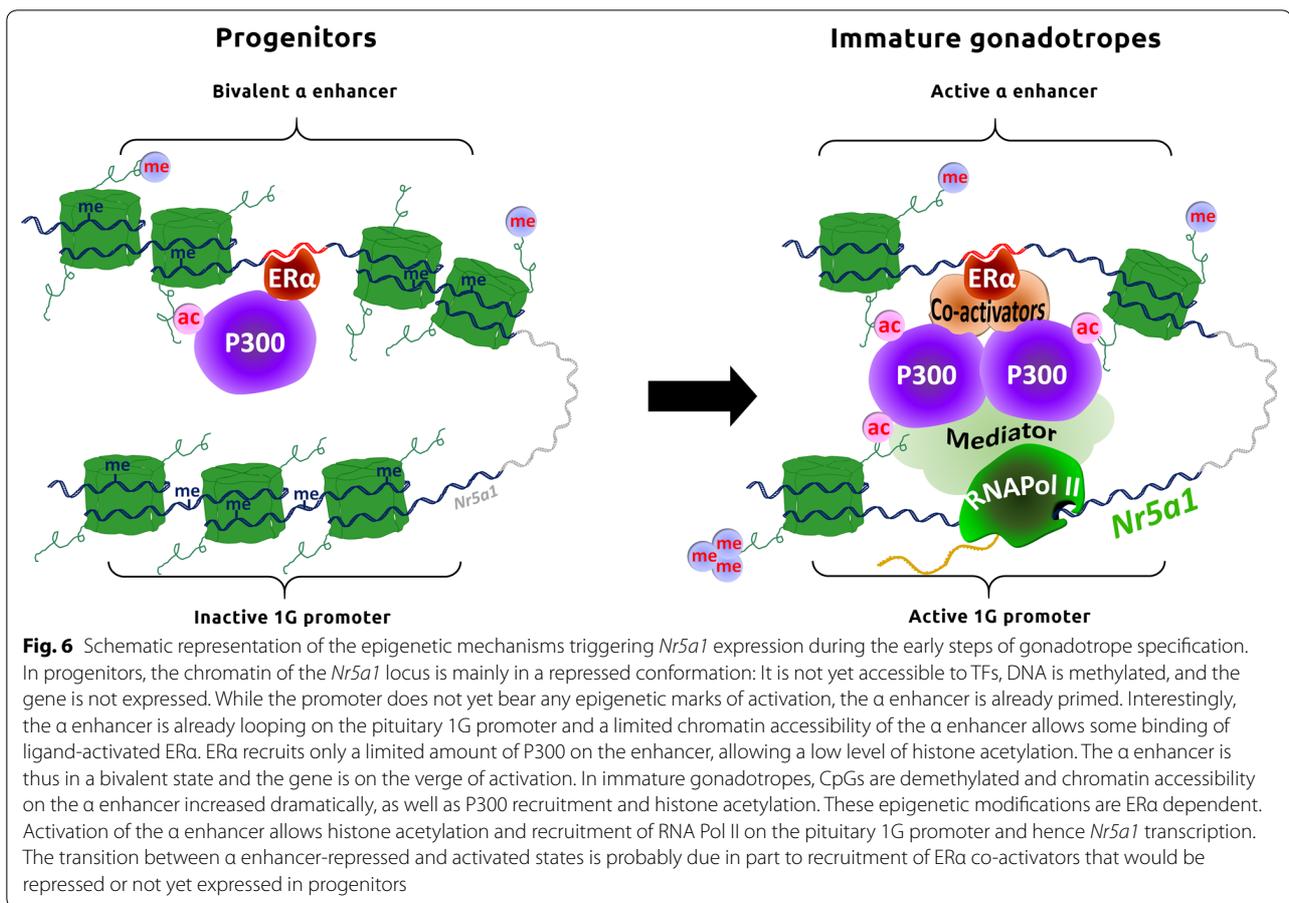
Methods

Cell cultures

The α T1–1, α T3–1 and L β T2 mouse gonadotrope cell lines (generously given by P. Mellon, University of California, La Jolla, CA) were grown in monolayer cultures using high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.2% penicillin/streptomycin, at 37 °C with 5% CO₂.

Antibodies

Antibodies were purchased from Abcam: anti-H3K4me1 ab8895; anti-H3K4me3 ab8580; anti-H3K27ac ab4729; anti-PolIII S-5-P ab5131; anti-ER α ab32063; anti-KAT3B ab19541, and from Santa Cruz: anti-GAPDH sc-25778.



ATAC-seq

Assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing analysis was performed as described [33]. Briefly, 50,000 nuclei from α T1-1, α T3-1 and L β T2 cell lines were transposed using Illumina Nextera Transposase. Library fragments were amplified using NEBnext PCR master mix and custom Nextera PCR primers. Sequencing was performed on a NextSeq 500 system at the ICM iGenSeq core facility from Paris. Three independent replicates were done for each line. Data analysis was performed according to Buenrostro et al. [33]. Briefly, ATAC-seq reads were mapped on mouse genome mm9 using Bowtie 2 [34] and peak calling was done using MACS2 [35]. Peaks were then tested for consistency among three independent replicates, and data visualization was done using IVG software [36].

ATAC-qPCR

Pregnant mice of the SWISS background at 12.5, 13.5 and 14.5 days *post coitum* were purchased from Janvier Labs. Mice were killed by cerebral dislocation and embryos retrieved and anesthetized in ice-cold PBS.

Developing pituitaries were dissected under magnification glasses. Six pituitaries from age-matched embryos were pooled and cells dispersed in high-glucose DMEM with 10% FBS supplemented with 1 mg/mL collagenase D and 40 U/mL DNase I for 30 min at 37 °C. Transposition, amplification and libraries were performed as described [33]. The experiment was performed three times independently in triplicates.

For each genomic region, specific enrichments were quantified by real-time PCR using LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics) and Takyon No ROX SYBR master mix (Eurogentec). Specific primers are described in Additional file 7. Raw qPCR data were normalized to control region and to E12.5 stage of development. The control region, already used in [14], is located at mm9 chr11:111,296,111–111,296,224 and is a region that displays neither enrichment for histone modifications, TF binding or chromatin accessibility so far on every tested tissues or cell types according to the ENCODE data. Change in chromatin accessibility between E12.5 and E13.5 or E12.5 and E14.5 embryonic stages was compared using a Mann–Whitney test.

DNase I hypersensitivity assay

DNase I-sensitive assay was performed as described [14]. Briefly, 50,000 nuclei were digested with 1 U RQ1 DNase I (Promega) for 5 min at 32 °C. DNA was then extracted by proteinase K treatment and phenol/chloroform extraction. DNA fragments were segregated by size by centrifugation for 24 h at 25,000 g on a 9% sucrose cushion. A 500- μ L fraction representing fragments of less than 1000 bp was collected at the top of the gradient and precipitated. The experiment was performed in triplicates on two independent clones. The α enhancer sequence enrichment in the purified DNA fractions was quantified by real-time PCR. Primers are described in Additional file 7.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP experiments were performed as described [14]. Briefly, 20 million cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min (or 30 min for P300 ChIP) at 37 °C, and then, formaldehyde was quenched by adding glycine (125 mM final). After nuclei extraction and lysis, chromatin was sheared by five 25-s rounds of sonication at 50% setting with a Bioblock Scientific Vibra-Cell sonicator. About 50 μ g of chromatin for histone chromatin epigenetic marks and 100 μ g for TFs along with 5 μ g of antibodies per immunoprecipitation were combined. Immunoprecipitation was carried out at 4 °C overnight using DynabeadsTM Protein G (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). After extensive washings and elution, chromatin cross-linking was reverted by heat and DNA purified using phenol/chloroform extraction and precipitation. Each ChIP experiment was performed at least six times independently.

For each genomic region, specific enrichments were quantified by real-time PCR. Specific primers are described in Additional file 7. Raw qPCR data were normalized to chromatin inputs and control region and were then compared using ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison, performed independently for each cell line and each histone marks or TF after checking for normal distribution using Kolmogorov–Smirnov test.

Luciferase reporter assay

Cloning of the *cis*-regulatory region: Genomic regions encompassing each potential *cis*-regulatory element were amplified from mouse DNA and cloned upstream from a minimal prolactin promoter (Prl) in the pGL3-basic vector (Promega) as previously described [37]. Truncated regions were obtained by PCR or fusion PCR. Primers for amplifications and truncations are described in Additional file 7.

Cell transfection: Briefly, 50,000 cells were transiently transfected in 96-well plates with 100 ng/well of pGL3

plasmids along with 5 ng/well of pRL-SV Renilla plasmid as an internal control for normalization, using Lipofectamine[®] 2000 (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. When indicated, cells were co-transfected with either Dharmacon ON-TARGETplus non-targeting control SiRNAs (D-001810-01-05) or ON-TARGETplus *Esr1* SiRNA (LQ-058688-01) at 10 pmol/well. When indicated, 24 h after transfection, cells were treated with either vehicle, E2, ICI 182,780 or MPP dihydrochloride at the indicated concentrations in complete steroid-containing or steroid-deprived medium. At 48 h after transfection, firefly and Renilla luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Each experiment was performed six times independently in quadruplicates. Data were normalized to Renilla and control Pluc–Prl plasmid level for each condition. Normal distribution was checked using Kolmogorov–Smirnov test, and ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests was performed independently for each cell line and each condition.

Bisulfite conversion of genomic DNA and sequencing

DNA methylation was performed as described previously [15]. Bisulfited fragments were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). At least five clones per cell line were selected and sequenced to determine the state of CpG methylation. Primers used for bisulfited DNA amplification are listed in Additional file 7.

Quantitative chromatin conformation capture

3C experiments were conducted as described [38]. Briefly, 10 million cells were cross-linked with 2% formaldehyde for 10 min at 25 °C, and formaldehyde was then quenched by adding glycine (125 mM final). After nuclei extraction, restriction using 750 U of HindIII was carried out overnight at 37 °C under gentle agitation. After enzyme inactivation, *in nucleus* ligations were performed overnight at 16 °C. Chromatin cross-linking was reverted by heat and DNA purified using phenol/chloroform extraction and precipitation. A BAC library containing all possible chimeric fragments in equal amount was generated as followed: About 10 μ g of RP23 225F7 *Nr5a1* BAC (gift from Dr CT. Gross, EMBL, Italy) was restricted with HindIII, religated and used as a control PCR template. For each cell line, four independent experiments were performed in triplicates. Chimeric DNA fragments quantification was carried out using specific primers encompassing the HindIII restriction sites on both the α enhancer and tested regions by qPCR. The BAC library was used as

a standard for unbiased concentration estimation. Data were normalized to the α enhancer and internal control Ci chimeric fragment level and analyzed using Kolmogorov–Smirnov test and ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests.

CRISPR/Cas9 deletions and dCas9–LSD1 enhancer inhibition

pLV hUbc-Cas9-T2A-GFP (#53190), pLV hUbc-dCas9-T2A-GFP (#53191) and pSPgRNA (#47108) plasmids [39] were purchased from Addgene. The *Lsd1* coding sequence was amplified from pET15B-hLSD1 (gift from Dr. Y. Shi, Harvard Medical School, Boston, USA) and cloned in frame of the C terminus of dCas9 in the pLV hUbc-dCas9-T2A-GFP plasmid. The specific guide RNAs were designed using CCTop online tool [40] and cloned in pSPgRNA plasmid.

About 5 million α T3–1 cells were electroporated with the Cas9 expression vector and sgRNA plasmids at a ratio of 1.5:8.5 μ g using a Neon[®] Transfection System (Invitrogen) according to the manufacturer’s protocol (two pulses at 1500 mV for 15 ms). The empty pSPgRNA was used as control. At 48 h post-transfection, GFP-positive cells were sorted using the FACS Aria II on the PIC2 facility of the Unit of Functional and Adaptive Biology.

For enhancer deletion studies, sorted cells were plated at low density and expanded. Single colonies were tested for deletion by PCR. A minimum of two independent homozygous clones were selected.

For enhancer decommissioning assay, sorted cells were directly processed for RNA extractions. These experiments were performed in triplicates, three times independently.

RNA extraction and mRNA quantification

Total RNA was isolated from cells using Trizol reagent according to the manufacturer’s protocol. RNAs (1 μ g) were reverse transcribed with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) using random primers according to the manufacturer’s instructions. Specific primers for qPCR quantification are described in Additional file 7. For each cell line, experiments were conducted four times independently in triplicates.

Protein extraction and western blot

Cellular proteins were extracted in Laemmli buffer and separated on a 10% SDS–PAGE. After transfer, nitrocellulose membranes were incubated with anti-ER α (1:1000) or anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:3000) antibody in Tris-buffered saline containing 0.01% Tween 20 (TBS-T) supplemented with 5%

milk overnight at 4 °C. After extensive washing, blots were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (GE healthcare #NA934V) in TBS-T/5% milk for 60 min at a room temperature and then washed. Immunodetection was performed using an enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare).

Immunohistochemistry staining of ER α

E12.5, E13.5 and E14.5 mouse embryos were proceeded for paraffin-embedded classical histology and were sectioned into 5- μ m thickness. The sections were mounted on positively charged slides. The slides were deparaffinized using Histolemon and re-hydrated. Epitopes retrieval was performed by incubation in 0.05% citraconic anhydride buffer (pH 7.4) at 100 °C for 15 min. Endogenous peroxidase was inhibited by incubation in 30% H₂O₂ for 20 min. Endogenous biotin molecules were blocked with endogenous avidin/biotin blocking kit (ab64212), and non-specific binding was blocked by incubation with 10% goat serum diluted in PBS for 1 h. Subsequently, the sections were incubated overnight in a humid chamber at RT 1 h with ER α antibody (1/200; ab32063 abcam). Sections were extensively washed and incubated for 1 h with the biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody (1/500; ab97049 abcam). Sections were extensively washed and incubated 1 h with HRP-conjugated streptavidin (1/1000; ab7403 abcam). The sections were finally treated with diaminobenzidine in the dark, washed, then rapidly counterstained with Mayer’s Hemalun and mounted in Eukitt medium.

Additional files

Additional file 1. Differential chromatin accessibility in gonadotropes expressed *gene* locus during specification. Chromatin accessibility was investigated by assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq) in α T1–1, α T3–1 and L β T2 gonadotrope cell lines. ATAC-seq tracks are shown for *Isl1*, *Cga*, *Gnrhr* and *Lhb* loci. Accessible chromatin regions identified from ATAC-seq results are shown for each cell line under each track (respectively, in gray, blue and yellow). In the last lane is shown genes structure (exon in blue boxes) with proximal promoters (red boxes).

Additional file 2. A The 3’ peak in *Nr5a1* α enhancer is inactive, while the 5’ peak displays differential *cis*-regulatory activity depending on gonadotrope differentiation stage. α T1–1, α T3–1 and L β T2 cells were transiently transfected with 5’ and 3’ peaks of the α region cloned in a pGL3b luciferase reporter system containing a minimal prolactin promoter (Pluc–PrI). Relative luciferase activity was measured as indicated in “Materials and Methods.” ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests was performed independently for each cell line. Results are normalized to control Pluc–PrI plasmid and are the mean \pm SEM of six independent experiments. Significant difference with the control construct: **c* *p* < 0.001.

B Deletion of the α enhancer using CRISPR/Cas9 in immature α T3–1 cells. Genomic sequences of the α enhancer of WT and a gRNA1–gRNA3- or a gRNA2–gRNA4-deleted α T3–1 clones were amplified and sequenced. The aligned genomic sequences of WT and deleted clones are shown along with the δ ERE–gRNA positions. **C** Schematic representation of the α

enhancer predicted transcription factor binding sites for 31 mammalian species. The α enhancer 65-bp core sequences for 31 mammalian species were analyzed using cisBP online library (18). Predicted TFBS are represented according to the position. Only the conserved DNA based is indicated.

Additional file 3. A The α enhancer is an inactive enhancer of *Nr5a1* in mature L β T2 cells. The α and the β enhancers were decommissioned in L β T2 cells using CRISPR/dCas9 fused with the lysine-specific histone demethylase LSD1 coding sequence (dCas9–LSD1). The dCas9–LSD1 was targeted to the α enhancer genomic sequence using the α gRNA1–gRNA3 gRNA couple and to the β enhancer genomic sequence using the β gRNA1–gRNA3 gRNA couple. Untargeting control gRNA (Ctr gRNA) was used as control. The 25% highly transfected cells were retrieved using cytometry cell sorting and tested for *Nr5a1* expression by RT-qPCR. *Nr5a1* expression level was normalized to *Gapdh*. Data are the normalized mean \pm SEM of three independent experiments and are compared to cells transfected with control untargeting gRNA using Student's *t*-test "*b*" $p < 0.01$. **B** The *cis*-regulatory activity of the α enhancer is strictly dependent on *Era* expression level and E2 in mature gonadotrope cells. L β T2 cells were transiently transfected with control (Pluc–Prl), full-length α enhancer (Pluc– α enh) or the mutated α enhancer (Pluc– α enh MutERE) constructs along with psg5 *Era* expression plasmid or psg5 control plasmid in a steroid-deprived medium. Transfected cells were treated with either vehicle or E2 at 1 nM. Relative luciferase activity was measured as indicated in "Materials and Methods." Results are normalized to corresponding Pluc–Prl plasmid and are the mean \pm SEM of six independent experiments. ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests was performed: significant difference with the vehicle condition (gray bar): "*c*" $p < 0.001$. **C** *Era* expression is sufficient to activate endogenous α enhancer in mature gonadotrope cells. L β T2 cells were transiently co-transfected with control (psg5), or psg5–*Era* expression plasmid and pEGFP-N1. An ATAC assay followed by real-time PCR quantification (ATAC-qPCR) was performed on the 25% highly transfected GFP cells retrieved using cytometry cell sorting. Quantitative PCR was performed using primers targeting *Nr5a1* α and β enhancers. Raw qPCR data were normalized to control region. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. Significant difference with the control psg5 transfected condition "*b*" $p < 0.01$.

Additional file 4. A *Era* binds to the α enhancer in progenitor α T1–1 gonadotropes. *Era* binding on the α enhancer chromatin was investigated using ChIP assays in α T1–1 cells. Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer genomic sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicates. Significant difference with the control region was analyzed using Student's *t*-test: "*b*" $p < 0.01$. **B** P300 binds to an enhancer in progenitor α T1–1 gonadotropes. P300 binding on the α enhancer chromatin was investigated using ChIP assays in α T1–1 cells. Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer genomic sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicates. Significant difference with the control region was analyzed using Student's *t*-test: "*c*" $p < 0.001$. **C** The *cis*-regulatory activity of the α enhancer is dependent on *Era* expression level in progenitor α T1–1 gonadotropes. α T1–1 cells were transiently co-transfected with control (Pluc–Prl) or full-length α enhancer (Pluc– α enh) Pluc constructs and with scramble or *Era* siRNA. Relative luciferase activity was measured as indicated in "Materials and Methods." Results were normalized to control Pluc–Prl plasmid and are the mean \pm SEM of three independent experiments in quadruplicates. Significant difference with the scramble siRNA using Student's *t*-test "*c*" $p < 0.001$.

Additional file 5. A Knockdown efficiency of *Era* siRNA in α T3–1 cells. α T3–1 cells were transiently transfected in duplicates with scramble or *Era* siRNA. Proteins were extracted 48 h later. Western blots for *Era* and GAPDH immunodetection were performed as indicated in "Materials and Methods." Top: *Era* immunodetection. The 66-kDa and the

36-kDa isoforms are expressed in α T3–1 cells. *Era* siRNA allows efficient knockdown of both isoforms. Bottom: GAPDH immunodetection for normalization. **B** *Era* specific antagonist MPP dihydrochloride modulates α enhancer *cis*-regulatory activity. α T3–1 cells were transiently transfected with control (Prl) or full-length α enhancer (α enh) Pluc constructs. Transfected cells were treated with either vehicle or MPP dihydrochloride at the indicated concentrations. Relative luciferase activity was measured as indicated in "Materials and Methods." Results were normalized for control Pluc–Prl–luc and are the mean \pm SEM of six independent experiments in quadruplicates. ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests was performed to compare drugs at different concentrations against vehicle condition. Significant difference with the vehicle: "*c*" $p < 0.001$.

Additional file 6. A *Era* expression in the developing mouse pituitary. *Era* immunohistochemistry analysis of pituitaries of embryos at E12.5, E13.5 and E14.5. *Era* is expressed at E12.5, E13.5 and E14.5 in the developing pituitary. Negative controls with no *Era* antibodies were performed and yielded no signal (data not shown). Magnification: 600X. **B** *Cyp19a1* and *Sis* expression during gonadotrope cell differentiation. *Cyp19a1* and *Sis* expressions in α T1–1, α T3–1 and L β T2 cells were measured by RT-qPCR. Expression level was normalized to *Gapdh*. Data are the normalized mean \pm SEM of three independent experiments. Significant difference with water: "*c*" $p < 0.001$. Nd: not detected.

Additional file 7. Primers used in this study.

Acknowledgements

This work benefited from equipment and services from the iGenSeq core facility, at ICM and the PIC2 facility from the Unit of Functional and Adaptive Biology. We are thankful to Blandine Gausserès for her help with the FACS experiments. We also thank Dr Pamela Mellon who developed and provided us the cell lines, Dr Shi Yang and Madeline Schuck for the gift of pET15B–hLSD1 plasmid and Dr Cornelius Gross and Dr Angelo Raggioli for the gift of the RP23–225F7 BAC. We are grateful to Dr Michel Cohen-Tannoudji for his constructive feedbacks.

Authors' contributions

VP and J-NL carried out the luciferase and ChIP experiments and analyzed the data. FP carried out the CRISPR/Cas9 experiments. BQ aided in interpreting the data and worked on the manuscript. J-NL and JC-T contributed to the interpretation of the results and work on the manuscript. DL conceived the study, carried out the ATAC experiments, analyzed the data and took lead in writing the manuscript. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript. The authors approved the submitted version of the manuscript and agreed both to be personally accountable for the author's own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and the resolution documented in the literature. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Paris Diderot Paris 7 University, from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). DL is recipient of a grant from *Société Française d'Endocrinologie*. VP is recipient of a fellowship from Paris Diderot University.

Availability of data and material

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 March 2019 Accepted: 7 July 2019
Published online: 07 August 2019

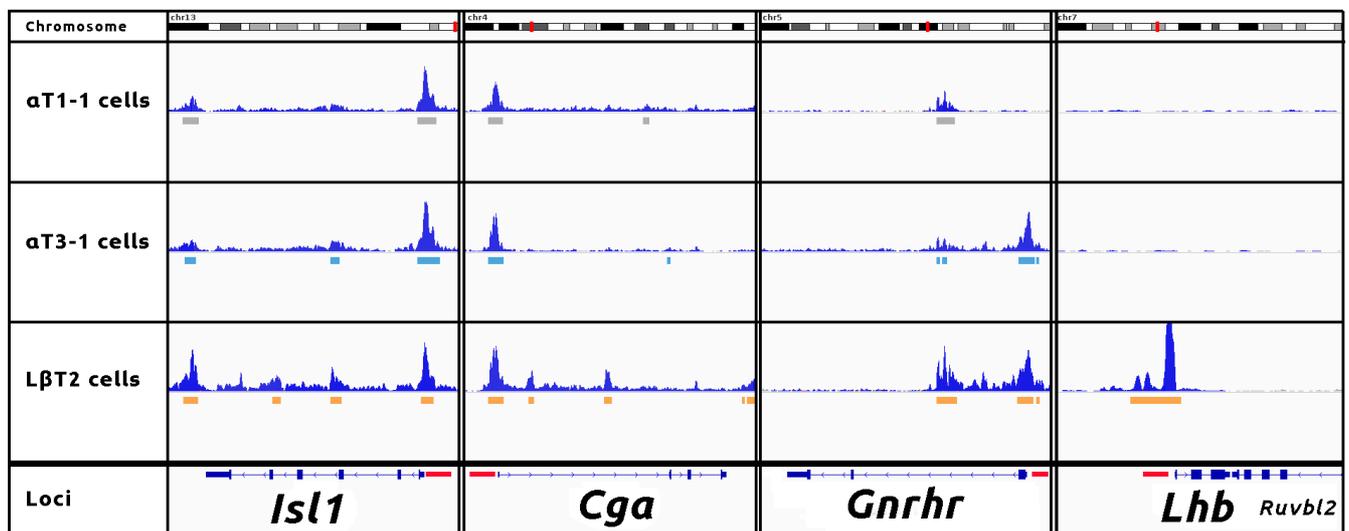
References

- Schimmer BP, White PC. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol*. 2010;24(7):1322–37.
- Rizzoti K, Lovell-Badge R. Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke's pouch. *Rev Endocr Metab Disord*. 2005;6(3):161–72.
- Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev*. 1990;4(5):695–711.
- Pulichino A-M, Vallette-Kasic S, Tsai JP-Y, Couture C, Gauthier Y, Drouin J. Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev*. 2003;17(6):738–47.
- Mayran A, Khetchoumian K, Hariri F, Pastinen T, Gauthier Y, Balsalobre A, et al. Pioneer factor Pax7 deploys a stable enhancer repertoire for specification of cell fate. *Nat Genet*. 2018;50(2):259–69.
- Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, et al. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev*. 1994;8(19):2302–12.
- Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46, XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):991–9.
- Kimura R, Yoshii H, Nomura M, Kotomura N, Mukai T, Ishihara S, et al. Identification of novel first exons in Ad4BP/SF-1 (NR5A1) gene and their tissue- and species-specific usage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278(1):63–71.
- Stallings NR, Hanley NA, Majdic G, Zhao L, Bakke M, Parker KL. Development of a transgenic green fluorescent protein lineage marker for steroidogenic factor 1. *Endocr Res*. 2002;28(4):497–504.
- Shima Y, Zubair M, Ishihara S, Shinohara Y, Oka S, Kimura S, et al. Ventromedial hypothalamic nucleus-specific enhancer of Ad4BP/SF-1 gene. *Mol Endocrinol*. 2005;19(11):2812–23.
- Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol*. 2006;26(11):4111–21.
- Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Katsura Y, Oka S, et al. Identification of an enhancer in the Ad4BP/SF-1 gene specific for fetal Leydig cells. *Endocrinology*. 2012;153(1):417–25.
- Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, et al. Pituitary homeobox 2 regulates adrenal4 binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol*. 2008;22(7):1633–46.
- Laverrière J-N, L'Hôte D, Tabouy L, Schang A-L, Quérat B, Cohen-Tannoudji J. Epigenetic regulation of alternative promoters and enhancers in progenitor, immature, and mature gonadotrope cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;15(434):250–65.
- Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, Mellon PL. immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development*. 1996;122(10):3319–29.
- Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol*. 1990;4(4):597–603.
- Xie H, Hoffmann HM, Meadows JD, Mayo SL, Trang C, Leming SS, et al. Homeodomain proteins SIX3 and SIX6 regulate gonadotrope-specific genes during pituitary development. *Mol Endocrinol*. 2015;29(6):842–55.
- Weirauch MT, Yang A, Albu M, Cote AG, Montenegro-Montero A, Drewe P, et al. Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell*. 2014;158(6):1431–43.
- Rhee HS, Closser M, Guo Y, Bashkirova EV, Tan GC, Gifford DK, et al. Expression of terminal effector genes in mammalian neurons is maintained by a dynamic relay of transient enhancers. *Neuron*. 2016;92(6):1252–65.
- Milewich L, Garcia RL, Gerrity LW. Steroid sulfatase and 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase activities in mouse tissues. *J Steroid Biochem*. 1984;21(5):529–38.
- Connolly PB, Resko JA. Estrone sulfatase activity in rat brain and pituitary: effects of gonadectomy and the estrous cycle. *J Steroid Biochem*. 1989;33(5):1013–8.
- Carretero J, Vázquez G, Blanco E, Rubio M, Santos M, Martín-Clavijo A, et al. Immunohistochemical evidence of the presence of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res*. 1999;295(3):419–23.
- Zheng W, Jimenez-Linan M, Rubin BS, Halvorson LM. Anterior pituitary gene expression with reproductive aging in the female rat. *Biol Reprod*. 2007;76(6):1091–102.
- Majdic G, Sharpe RM, Saunders PT. Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;127(1):91–8.
- Brannick KE, Craig ZR, Himes AD, Peretz JR, Wang W, Flaws JA, et al. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A increases pituitary proliferation and gonadotroph number in female mice offspring at birth. *Biol Reprod*. 2012;87(4):82.
- Miranda-Carboni GA, Guemes M, Bailey S, Anaya E, Corselli M, Peault B, et al. GATA4 regulates estrogen receptor- α -mediated osteoblast transcription. *Mol Endocrinol*. 2011;25(7):1126–36.
- Jefferson WN, Kinyamu HK, Wang T, Miranda AX, Padilla-Banks E, Suen AA, et al. Widespread enhancer activation via ER α mediates estrogen response in vivo during uterine development. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(11):5487–503.
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*. 2006;38(11):1289–97.
- Li W, Hu Y, Oh S, Ma Q, Merkurjev D, Song X, et al. Condensin I and II complexes license full estrogen receptor α -dependent enhancer activation. *Mol Cell*. 2015;59(2):188–202.
- Fleischer T, Tekpli X, Mathelier A, Wang S, Nebdal D, Dhakali HP, et al. Oslo Breast Cancer Research Consortium (OSBREAC), Børresen-Dale AL, et al. DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages. *Nat Commun*. 2017;8(1):1379.
- Murakami S, Nagari A, Kraus WL. Dynamic assembly and activation of estrogen receptor α enhancers through coregulator switching. *Genes Dev*. 2017;31(15):1535–48.
- Manavathi B, Samanthapudi VSK, Gajulapalli VNR. Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:34.
- Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*. 2013;10(12):1213–8.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357–9.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. 2008;9(9):R137.
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative genomics viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):178–92.
- Pincas H, Amoyel K, Counis R, Laverrière JN. Proximal *cis*-acting elements, including steroidogenic factor 1, mediate the efficiency of a distal enhancer in the promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol*. 2001;15(2):319–37.
- Hagège H, Klous P, Braem C, Splinter E, Dekker J, Cathala G, et al. Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat Protoc*. 2007;2(7):1722–33.
- Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(19):e147.
- Stemmer M, Thumberger T, del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124633.

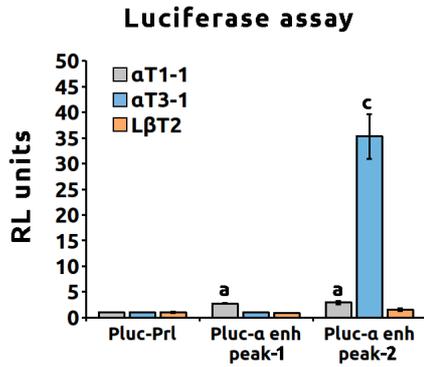
Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ATAC-seq analysis of chromatin accessibility of genes expressed in gonadotrope cells



Additional file 1. Differential chromatin accessibility in gonadotropes expressed gene locus during specification. Chromatin accessibility was investigated by assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq) in αT1-1, αT3-1 and LβT2 gonadotrope cell lines. ATAC-seq tracks are shown for *Isl1*, *Cga*, *Gnrhr* and *Lhb* loci. Accessible chromatin regions identified from ATAC-seq results are shown for each cell line under each track (respectively, in gray, blue and yellow). In the last lane is shown genes structure (exon in blue boxes) with proximal promoters (red boxes).

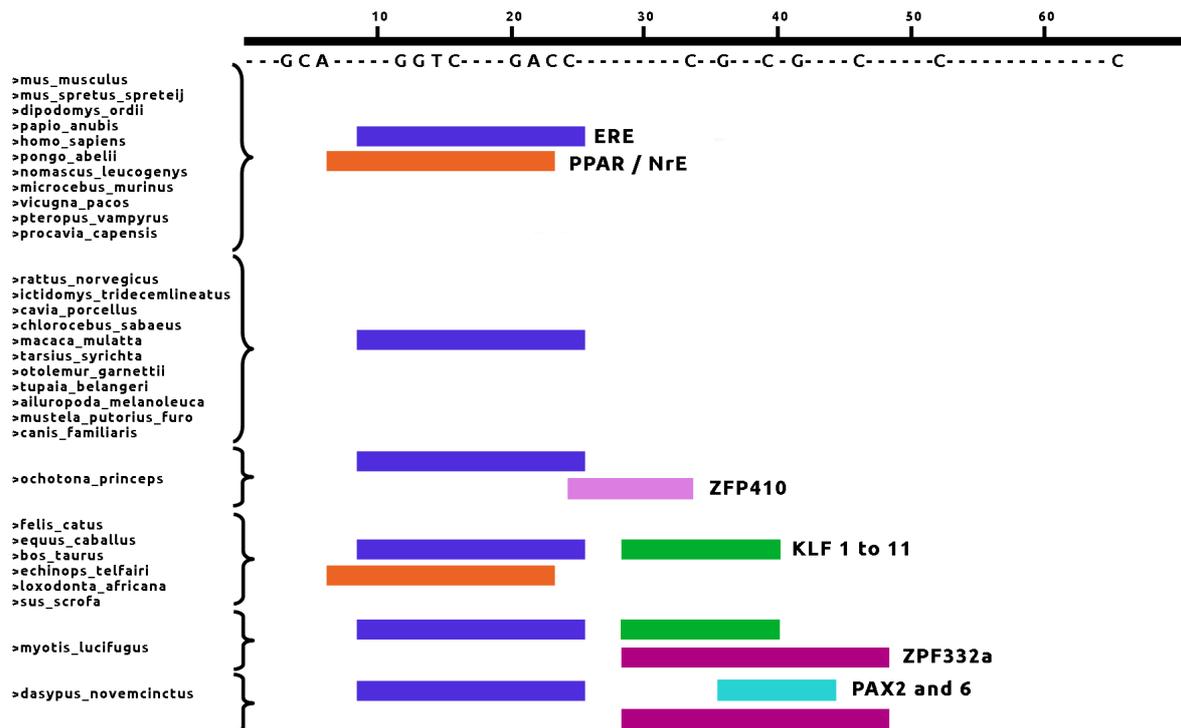
A**B**

Genomic sequences alignment of WT or deleted peak-2 α enhancer

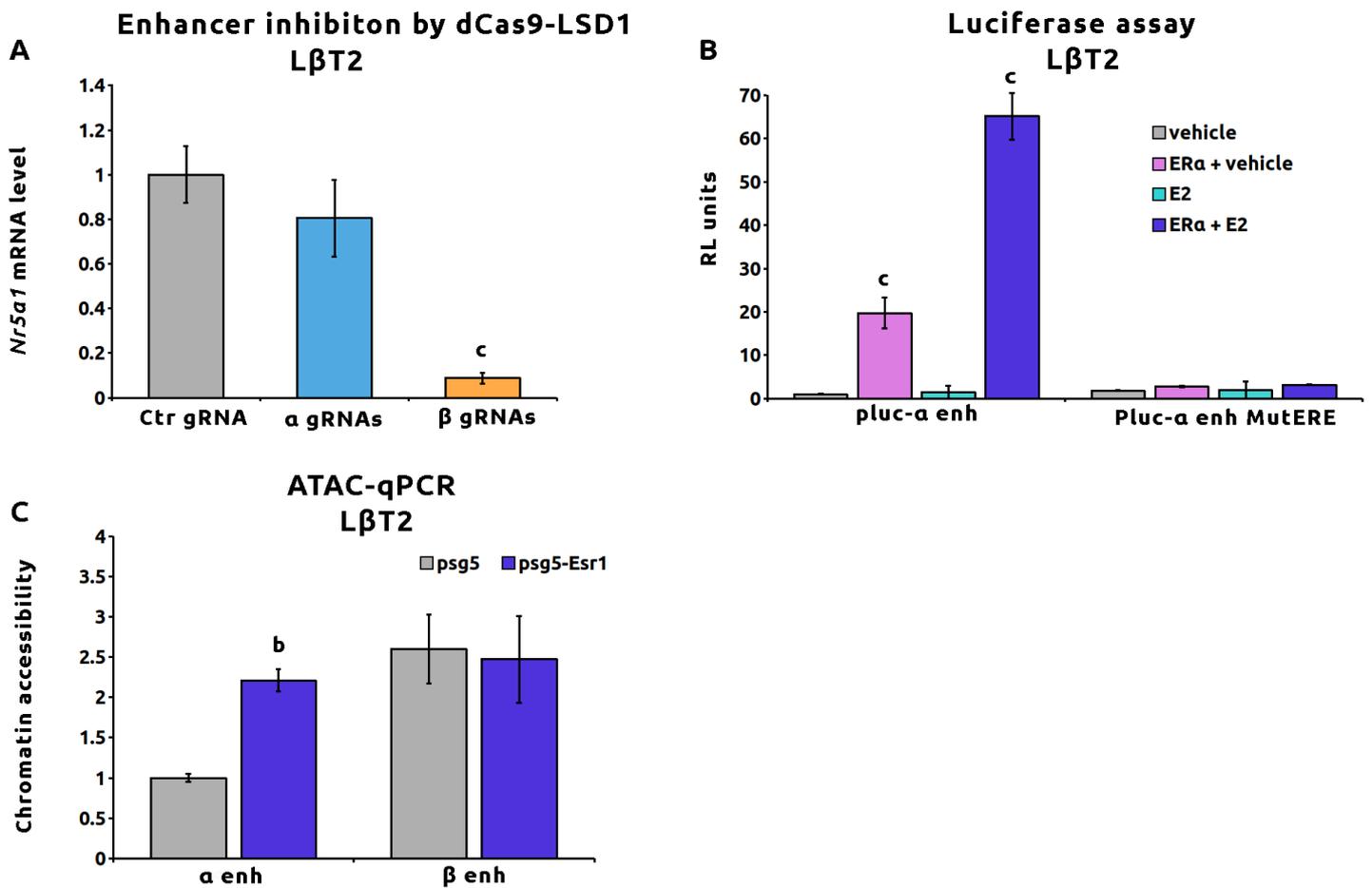
WT_enh-α_gRNA2	TGCCCGATTGTTTCAATGCAGAAAGGGAAGAGCGTCTTCTCTATCAGATCAGGAAA	60
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	TGCCCGATTGTTTCAATGCAGAAAGGGAAGAGCGTCTTCTCTATCAGATCAGGAAA	60
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	TGCCCGATTGTTTCAATGCAGAAAGGGAAGAGCGTCTTCTCTATCAGATCAGGAAA	60
enh-α_gRNA2		
WT_enh-α_gRNA1	TGATGGTGGAGAGGCCCATGACCAAGT	120
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	TGATGGTGGAGAGGCCCATGACCAAGT	89
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	TGATGGTGGAGAGGCCCATGACCAAGT	67
enh-α_gRNA1		
WT_enh-α_gRNA2	AGCATAGCCTCACACTGCAGGCTTCTGTTGCTCTCAAGCTGGCCAGCCAGCCACACA	180
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	AGCATAGCCTCACACTGCAGGCTTCTGTTGCTCTCAAGCTGGCCAGCCAGCCACACA	180
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	AGCATAGCCTCACACTGCAGGCTTCTGTTGCTCTCAAGCTGGCCAGCCAGCCACACA	180
enh-α_gRNA2		
WT_enh-α_gRNA1	GCTGAGGCTCTGGTAGAGTCTGCTGAGGCTGGCCAGCCAGGTCGATGACCTCTCTG	240
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	GCTGAGGCTCTGGTAGAGTCTGCTGAGGCTGGCCAGCCAGGTCGATGACCTCTCTG	240
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	GCTGAGGCTCTGGTAGAGTCTGCTGAGGCTGGCCAGCCAGGTCGATGACCTCTCTG	240
enh-α_gRNA1		
WT_enh-α_gRNA2	CCTTCTGCCAAGGCTCAGTCTGCTTATCTCTTACTGCTCTTTATGCTCTCTCTGCTC	300
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	CCTTCTGCCAAGGCTCAGTCTGCTTATCTCTTACTGCTCTTTATGCTCTCTCTGCTC	300
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	CCTTCTGCCAAGGCTCAGTCTGCTTATCTCTTACTGCTCTTTATGCTCTCTCTGCTC	300
enh-α_gRNA2		
WT_enh-α_gRNA1	CTGCTTCTCCATCTGGCCAGGATATCTGCTGCTATGCTCTGATGGGAGCAGACA	360
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	CTGCTTCTCCATCTGGCCAGGATATCTGCTGCTATGCTCTGATGGGAGCAGACA	16
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	CTGCTTCTCCATCTGGCCAGGATATCTGCTGCTATGCTCTGATGGGAGCAGACA	56
enh-α_gRNA4		
WT_enh-α_gRNA2	TGCTCAACCTGCTGGCCCTCTTCTGGCTCACCACATGGCTCTATTACTTTGTTG	420
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	TGCTCAACCTGCTGGCCCTCTTCTGGCTCACCACATGGCTCTATTACTTTGTTG	75
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	TGCTCAACCTGCTGGCCCTCTTCTGGCTCACCACATGGCTCTATTACTTTGTTG	117
enh-α_gRNA3		
WT_enh-α_gRNA1	CCACTGTGACCGTCTTAGGTTTCTTTTCCGCCACCCAGGATCCAGAAAGTCTAAG	480
δ_enh-α_gRNA1-gRNA3	CCACTGTGACCGTCTTAGGTTTCTTTTCCGCCACCCAGGATCCAGAAAGTCTAAG	136
δ_enh-α_gRNA2-gRNA4	CCACTGTGACCGTCTTAGGTTTCTTTTCCGCCACCCAGGATCCAGAAAGTCTAAG	175

C

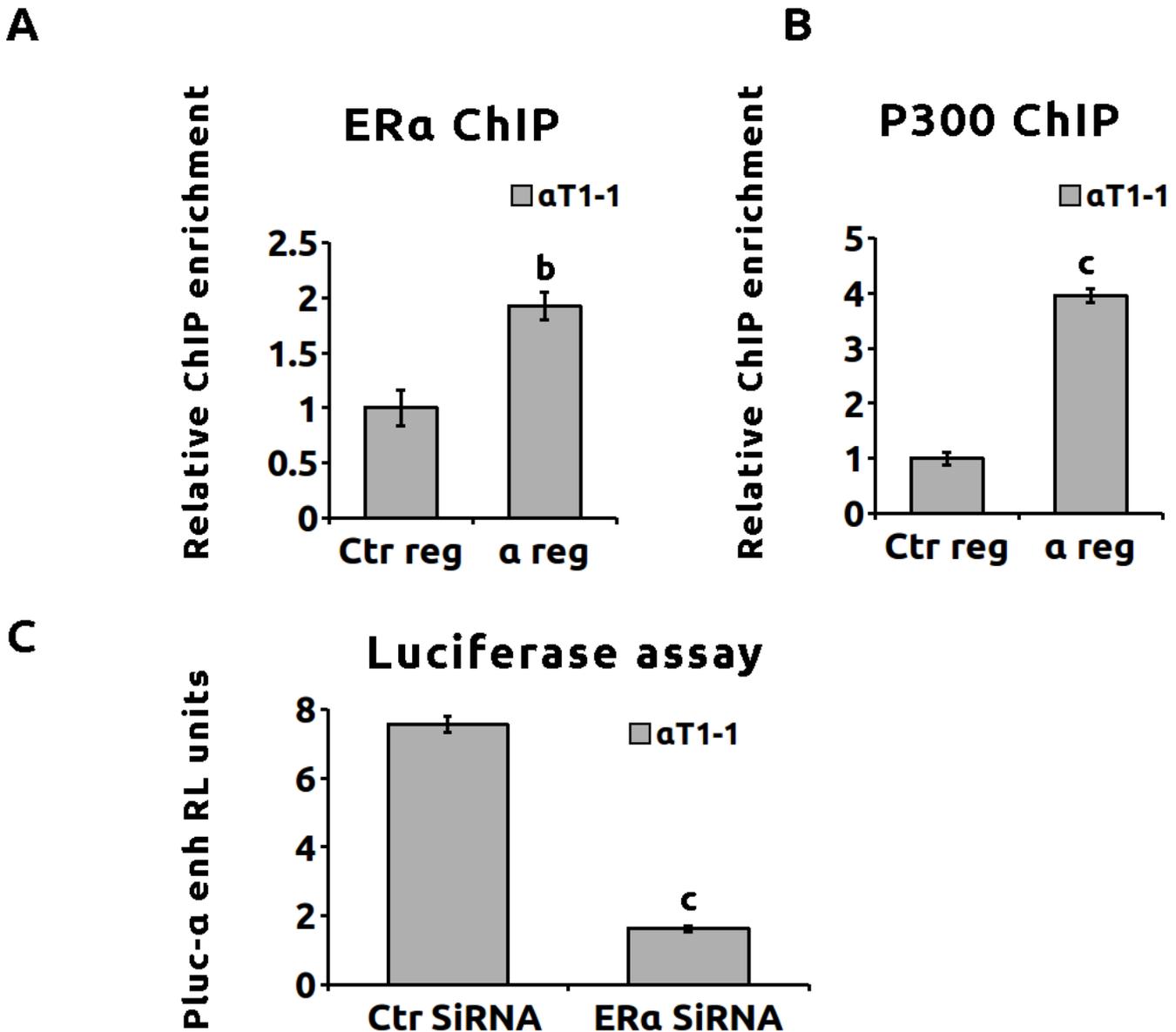
Schematic representation of α enhancer predicted TFBS for 31 mammal species



Additional file 2. A The 3' peak in Nr5a1 α enhancer is inactive, while the 5' peak displays differential cis-regulatory activity depending on gonadotrope differentiation stage. αT1-1, αT3-1 and LβT2 cells were transiently transfected with 5' and 3' peaks of the α region cloned in a pGL3b luciferase reporter system containing a minimal prolactin promoter (Pluc-Prl). Relative luciferase activity was measured as indicated in "Materials and Methods." ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests was performed independently for each cell line. Results are normalized to control Pluc-Prl plasmid and are the mean ± SEM of six independent experiments. Significant difference with the control construct: "c" p < 0.001. **B** Deletion of the α enhancer using CRISPR/Cas9 in immature αT3-1 cells. Genomic sequences of the α enhancer of WT and α gRNA1-gRNA3- or α gRNA2-gRNA4-deleted αT3-1 clones were amplified and sequenced. The aligned genomic sequences of WT and deleted clones are shown along with the δERE-gRNA positions. **C** Schematic representation of the α enhancer predicted transcription factor binding sites for 31 mammal species. The α enhancer 65-bp core sequences for 31 mammalian species were analyzed using cisBP online library (18). Predicted TFBS are represented according to the position. Only the conserved DNA based is indicated.

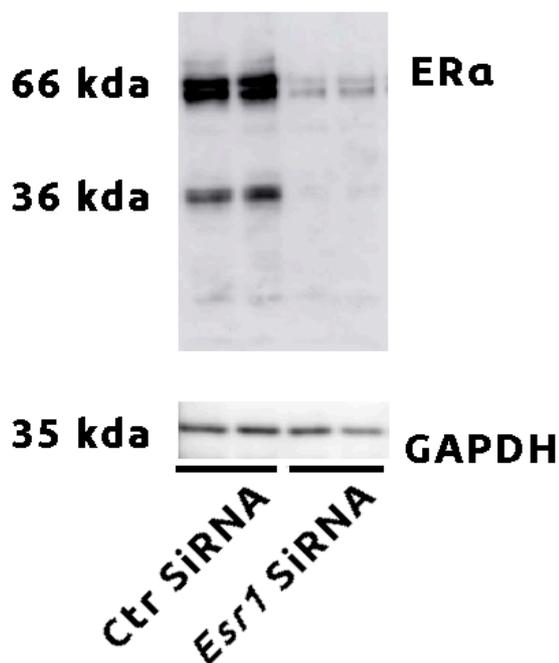


Additional file 3. A The α enhancer is an inactive enhancer of *Nr5a1* in mature L β T2 cells. The α and the β enhancers were decommissioned in L β T2 cells using CRISPR/dCas9 fused with the lysine-specific histone demethylase LSD1 coding sequence (dCas9–LSD1). The dCas9–LSD1 was targeted to the α enhancer genomic sequence using the α gRNA1–gRNA3 gRNA couple and to the β enhancer genomic sequence using the β gRNA1–gRNA3 gRNA couple. Untargeting control gRNA (Ctr gRNA) was used as control. The 25% highly transfected cells were retrieved using cytometry cell sorting and tested for *Nr5a1* expression by RT-qPCR. *Nr5a1* expression level was normalized to *Gapdh*. Data are the normalized mean \pm SEM of three independent experiments and are compared to cells transfected with control untargeting gRNA using Student's t test "b" $p < 0.01$. **B** The cis-regulatory activity of the α enhancer is strictly dependent on *ER α* expression level and E2 in mature gonadotrope cells. L β T2 cells were transiently transfected with control (Pluc–PrI), full-length α enhancer (Pluc– α enh) or the mutated α enhancer (Pluc– α enh MutERE) constructs along with psg5 *ER α* expression plasmid or psg5 control plasmid in a steroid-deprived medium. Transfected cells were treated with either vehicle or E2 at 1 nM. Relative luciferase activity was measured as indicated in "Materials and Methods." Results are normalized to corresponding Pluc–PrI plasmid and are the mean \pm SEM of six independent experiments. ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests was performed: significant difference with the vehicle condition (gray bar): "c" $p < 0.001$. **C** *ER α* expression is sufficient to activate endogenous α enhancer in mature gonadotrope cells. L β T2 cells were transiently co-transfected with control (psg5), or psg5-*ER α* expression plasmid and pEGFP-N1. An ATAC assay followed by real-time PCR quantification (ATAC-qPCR) was performed on the 25% highly transfected GFP cells retrieved using cytometry cell sorting. Quantitative PCR was performed using primers targeting *Nr5a1* α and β enhancers. Raw qPCR data were normalized to control region. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. Significant difference with the control psg5 transfected condition "b" $p < 0.01$.

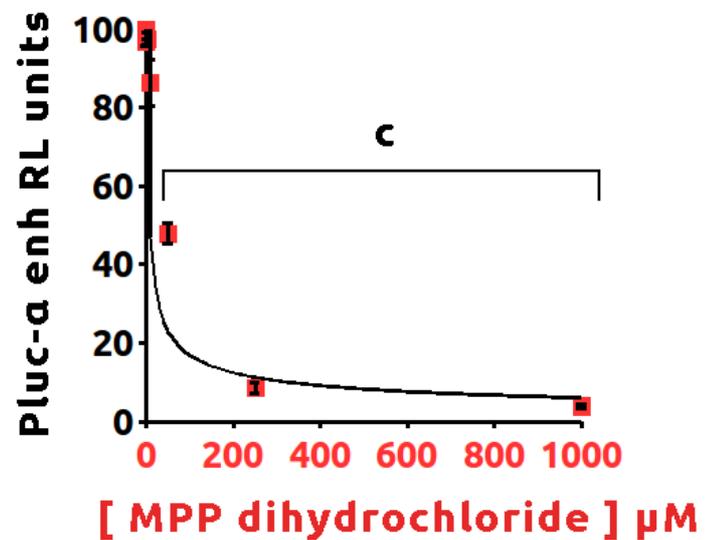


Additional file 4. A ER α binds to the α enhancer in progenitor α T1-1 gonadotropes. ER α binding on the α enhancer chromatin was investigated using CHIP assays in α T1-1 cells. Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer genomic sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicates. Significant difference with the control region was analyzed using Student's t-test: "b" $p < 0.01$. **B** P300 binds to α enhancer in progenitor α T1-1 gonadotropes. P300 binding on the α enhancer chromatin was investigated using CHIP assays in α T1-1 cells. Quantitative PCR was performed using primers targeting the α enhancer genomic sequence. Raw qPCR data were normalized to input. The final results were expressed as fold over the control region. Results are the mean \pm SEM of three independent experiments in triplicates. Significant difference with the control region was analyzed using Student's t-test: "c" $p < 0.001$. **C** The cis-regulatory activity of the α enhancer is dependent on ER α expression level in progenitor α T1-1 gonadotropes. α T1-1 cells were transiently co-transfected with control (Pluc-PrI) or full-length α enhancer (Pluc- α enh) Pluc constructs and with scramble or ER α SiRNA. Relative luciferase activity was measured as indicated in "Materials and Methods." Results were normalized to control Pluc-PrI plasmid and are the mean \pm SEM of three independent experiments in quadruplicates. Significant difference with the scramble SiRNA using Student's t-test "c" $p < 0.001$.

A Western-Blot

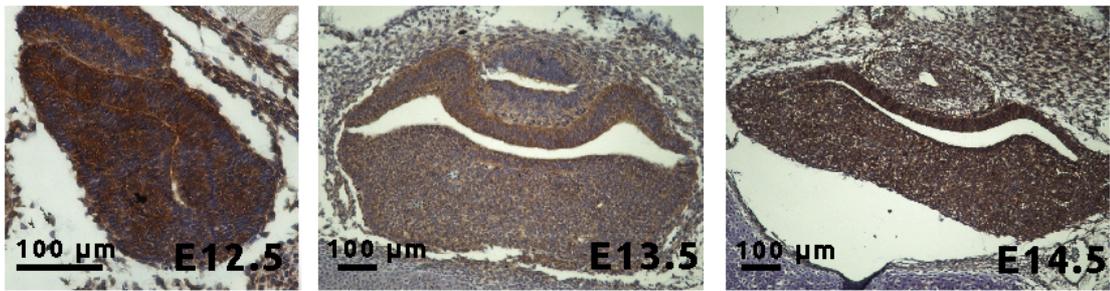


B Luciferase assay

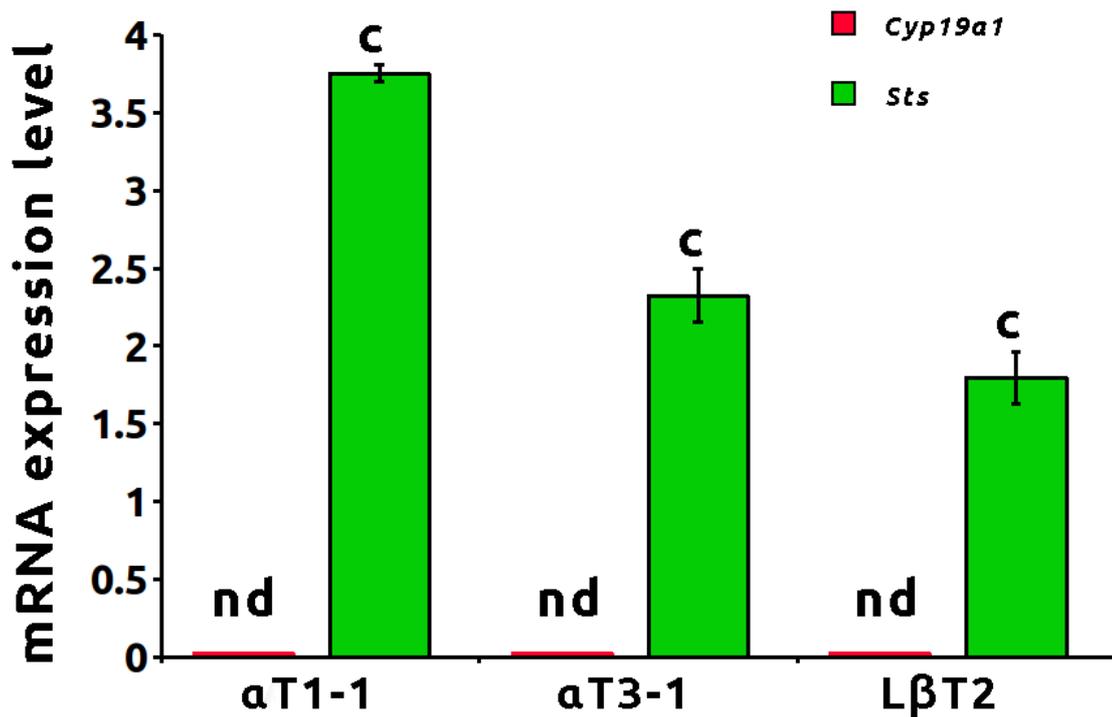


Additional file 5. A Knockdown efficiency of ERα SiRNA in αT3-1 cells. αT3-1 cells were transiently transfected in duplicates with scramble or ERα SiRNA. Proteins were extracted 48 h later. Western blots for ERα and GAPDH immunodetection were performed as indicated in “Materials and Methods.” Top: ERα immunodetection: The 66-kDa and the 36-kDa isoforms are expressed in αT3-1 cells. ERα SiRNA allows efficient knockdown of both isoforms. Bottom: GAPDH immunodetection for normalization. **B** ERα specific antagonist MPP dihydrochloride modulates α enhancer cis-regulatory activity. αT3-1 cells were transiently transfected with control (PrI) or full-length α enhancer (α enh) Pluc constructs. Transfected cells were treated with either vehicle or MPP dihydrochloride at the indicated concentrations. Relative luciferase activity was measured as indicated in “Materials and Methods.” Results were normalized for control Pluc-PrI-luc and are the mean ± SEM of six independent experiments in quadruplicates. ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison tests was performed to compare drugs at different concentrations against vehicle condition. Significant difference with the vehicle: “c” p < 0.001.

A ER α immunodetection in developing pituitaries



B *Cyp19a1* and *Sts* expression quantification by RT-qPCR



Additional file 6. A ER α expression in the developing mouse pituitary. ER α immunohistochemistry analysis of pituitaries of embryos at E12.5, E13.5 and E14.5. ER α is expressed at E12.5, E13.5 and E14.5 in the developing pituitary. Negative controls with no ER α antibodies were performed and yielded no signal (data not shown). Magnification: 600X. **B** *Cyp19a1* and *Sts* expression during gonadotrope cell differentiation. *Cyp19a1* and *Sts* expressions in α T1-1, α T3-1 and L β T2 cells were measured by RT-qPCR. Expression level was normalized to Gapdh. Data are the normalized mean \pm SEM of three independent experiments. Significant difference with water: "c" $p < 0.001$. Nd: not detected.

Additional file 7. Primers used in this study.

Primers for amplification and cloning in pGL3

FLEnhancer F	ATGATGA AAGCTT CCTAGTGAGCCACTGGAGGA
FLEnhancer R	ATGATG ACCGGT AGCTGTGGAGACCCCATTC
Prom1G F	ATGATG GGTGACC CTGGTGGCTAAGGAG
Prom1G R	CATCAT CTCGAGG TTCTTGTCTCCCTCCC
α Enhancer peak1 F	AAGTGCA AAGCTT TGCCCGATTGTTTCAATGCAGA
α Enhancer peak1 R	TGCCA AAGGT CACCGATACTCATGGGACAGATAGTCA
α Enhancer peak2 F	CATCTACA AAGCTT AGGCCGGAGAGCTGATTCCGGCA
α Enhancer peak2 R	GGAAAT GGTCACC ACAGTCAGTCATCAGTTCT
β Enhancer F	ATGATGA AAGCTT AGGGAAGGGAGGAGG
β Enhancer R	CATCAT GGTCACC TTGTCAACCAAACCCC
α Enhancer +65 F	ATGATGA AAGCTT AGCTGAGGTCTGGGTAGAGT
α Enhancer +65 R	ATGATG GGTGACC AGGTCACATCGACCTGGGT
α Enhancer Δ 65 F	GGGCCAGCCAGCCCCTTCTGCCAAGGCTC
α Enhancer Δ 65 R	GAGCCTTGGCAGAAGGGGCTGGCTGGCCC
α Enhancer mutERE F	CTGGGCACCCAGATCAATGTGATCTCTCTGCCT
α Enhancer mutERE R	AGGCAGAGAGATCACATTGATCTGGGTGCCAG

Primers for ChIP qPCR, ATAC-qPCR and DNASE I HS-qPCR

Control region F	TGCATAAATCAAATGCCATA
Control region R	GCAAAGGTGATTTGCAGAAA
FL Enhancer F	CGTGTGCGCTTTGAGATAAA
FL Enhancer R	GGGCTGAACCTCTAGCCTTG
PromPit F	CTTCCCCACTGAGGCTTTCT
PromPit R	CACCAGACCAGATGGCTTTT
EnhAlpha F	ATAAGACGGTCACAGTGGCA
EnhAlpha R	CCTATGCCTGAGATGGGGAC
EnhBeta F	AGGGATTAGAGGGCCAAGAG
EnhBeta R	GGGTCACCTCATCTGCTTTCC

Primers used for bisulfite converted DNA amplification

Sf1 alpha MethylF1	TTGGTTAAAAGGAAAATGGAGTA
Sf1 alpha MethylR1	CCAAAAAAAAACCCAACAAA
Sf1 Leydig MethylF1	GAGGAAAAGTTAGTAGGTTTAAT
Sf1 Leydig MethylR1	CTAATAATAAAAAAAAAACCCC
SfProPit51	TTGAAAAGTTATTTGGTTTGGTGTA
RSfProPit31	AAACACCCACTCCAACCCTATATT

Primers used for gRNAs

gRNA α enhancer 1 F	caccGCCACTGTGACCGTCTTAT
gRNA α enhancer 1 R	aaacATAAGACGGTCACAGTGGC
gRNA α enhancer 2 F	caccGAGAATGCTCAACCCTGCT
gRNA α enhancer 2 R	aaacAGCAGGGTTGAGCATTCTC
gRNA α enhancer 3 F	caccGAGCGCATGACCAGGTGAA
gRNA α enhancer 3 R	aaacTTCACCTGGTCATGCGCTC
gRNA α enhancer 4 F	caccGATCAGGAAATGATGGTTG
gRNA α enhancer 4 R	aaacCAACCATCATTTCTGATC

gRNA β enhancer 1 F	caccGAGCTGGGCCTGAGTCGTA
gRNA β enhancer 1 R	aaacTACGACTCAGGCCAGCTC
gRNA β enhancer 2 F	caccGTAGGCTCCGAGGGCTGGG
gRNA β enhancer 2 R	aaacCCCAGCCCTCGGAGCCTAC
DeltaERE aEnh 1 F	caccGCTGCAGGGCTGGGCACCC
DeltaERE aEnh 1 R	aaacGGGTGCCAGCCCTGCAGC
DeltaERE aEnh 2 F	caccGCCTTGGCAGAAGGCAGAG
DeltaERE aEnh 2 R	aaacCTCTGCCTTCTGCCAAGGC
gRNA FL enhancer 1 F	caccGGTATTCTCATCTACGAGT
gRNA FL enhancer 1 R	aaacACTCGTAGATGAGAATACC
gRNA FL enhancer 2 F	caccGCTACTTCTCAAGACGGAG
gRNA FL enhancer 2 R	aaacCTCCGTCTTGAGAAGTAGC
gRNA FL enhancer 3 F	caccGGTCTTCCTTACCATTAGC
gRNA FL enhancer 3 R	aaacGCTAATGGTAAGGAAGACC
gRNA FL enhancer 4 F	caccGTAAGCTCAGCTTCGACGC
gRNA FL enhancer 4 R	aaacGCGTCGAAGCTGAGCTTAC

Primers used for qRT-PCR

mGapdh F	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG
mGapdh R	GTCGTTGATGGCAACAATCTC
mNr5a1 F	TTACACGTGCACCGAGAGTC
mNr5a1 R	TGCTTTCTTCTGCTGCTTCA
mEsr1 F	TCCCATATCCGGCACATGAG
mEsr1 R	CATCCAACATCTCCAGGAGC
mEsr2 F	GTCAGGCACATCAGTAACAA
mEsr2 R	GGGAGCCCTCTTTGCTCTTA
mSts F	AGCACGAGTTCCTGTTCCACT
mSts R	AAGTTGGGCGTGAAGTAGAAGGC
mCyp19a1 F	TACTTCATGTTACTTCTCGTCCG
mCyp19a1 R	TATCCTCGATCTTTATGTCTCTGTCAC

Primers used for 3C

3C Ce	TCTCGAAGCTGATCAGTGCA
3C FL	CACAGAAGGGCAAGCAATGT
3C 1G	AACTGGACTAGCAAACGGGA
3C α enh	GGAGTATGAGAGGGCAGGAC
3C Ci	CCATTTGTTTCTGGCAGGTT

Article 2 : « ER α orchestre les mécanismes épigénétiques qui déclenchent l'expression du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire ». Pacini V, *et al.* *Medecine/Science*, 2020

ER α orchestre les mécanismes épigénétiques qui déclenchent l'expression du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire

Vincent Pacini, Florence Petit, Bruno Quérat, Jean-Noël Laverrière, Joëlle Cohen-Tannoudji, David L'hôte

Équipe Physiologie de l'axe gonadotrope de l'unité Biologie fonctionnelle et adaptative, université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, ERL U1133, Inserm, 4 rue Marie Andrée Lagroua Weill-Hallée, 75013 Paris, France.

david.lhote@u-paris.fr

vincent.pacini@hotmail.fr

► L'hypophyse est une glande endocrine située à l'interface entre le système nerveux central et différents tissus cibles. Elle comporte six types cellulaires endocrines différents contrôlant des fonctions essentielles du vivant. La fonction de reproduction est sous le contrôle des cellules gonadotropes hypophysaires qui, en réponse à la neuro-hormone hypothalamique GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), synthétisent et sécrètent les deux hormones gonadotropes, LH (*luteinizing hormone*) et FSH (*follicle-stimulating hormone*). Ces hormones contrôlent à leur tour la stéroïdogénèse et la gamétogénèse dans les gonades, ovaires ou testicules. Les différents lignages endocrines de l'hypophyse se différencient au cours de l'embryogenèse à partir des mêmes cellules souches. Sous l'action de gradients morphogénétiques, différents facteurs de transcription sont synthétisés par ces cellules, permettant la différenciation en l'un ou l'autre des types cellulaires endocrines. Pour les cellules gonadotropes, le facteur de transcription inducteur de la différenciation est le récepteur nucléaire SF-1 (*steroidogenic factor-1*) [1]. L'expression du gène *Sf-1* dans les cellules gonadotropes débute à partir de 13,5 jours de développement embryonnaire chez la souris (E13,5). Elle permet notamment de déclencher l'expression des gènes clefs de la fonction gonadotrope, tels que le gène codant le récepteur de la GnRH et ceux

codant les sous-unités β spécifiques des hormones gonadotropes. Ainsi, des mutations du gène *Sf-1* humain ou une extinction spécifique de l'expression de *Sf-1* dans l'hypophyse chez la souris entraîne une stérilité [2,3].

L'expression du gène *Sf-1* n'est pas restreinte aux cellules gonadotropes. Elle dépend d'un promoteur, 1A ou 1G, ainsi que de séquences régulatrices distales, ou *enhancers*, qui diffèrent selon le type cellulaire. Dans les cellules gonadotropes, l'expression de *Sf-1* est contrôlée essentiellement par le promoteur 1G [4] et par un *enhancer* pituitaire, localisé dans le 6^e intron du gène [5]. Nous avons effectué une étude épigénétique des séquences régulatrices de *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope [6]. Si cette étude a confirmé que l'*enhancer* pituitaire est actif dans les cellules gonadotropes matures, elle a également révélé qu'il ne l'est pas à des stades précoces de la différenciation de ce lignage, ce qui remettait en question son rôle dans l'émergence de l'expression de *Sf-1* au cours du développement hypophysaire.

Identification de l'*enhancer* le plus précocement impliqué dans l'expression de *Sf-1* dans les cellules gonadotropes hypophysaires

Dans un premier temps, nous avons identifié l'ensemble des régions régulatrices potentielles du génome en mesurant l'ac-

cessibilité de la chromatine par la technique ATAC-seq (*assay for transposase-accessible chromatin using sequencing*) [7]. Nous avons utilisé trois modèles de cellules murines immortalisées, qui reproduisent trois stades phénotypiques de la différenciation du lignage gonadotrope : les cellules α T1-1, dérivées de cellules précurseurs de l'hypophyse à E11,5 et n'exprimant pas encore *Sf-1*, les cellules α T3-1, « immatures », dérivées de cellules déjà engagées dans la différenciation gonadotrope, qui expriment *Sf-1* mais pas encore l'ensemble des gènes marqueurs du lignage, et les cellules L β T2, dérivées de cellules gonadotropes différenciées, exprimant *Sf-1* et l'ensemble des gènes clefs du lignage [8]. Cette étude a confirmé l'absence d'accessibilité de l'*enhancer* pituitaire dans les cellules gonadotropes immatures, et nous a permis de découvrir une autre région potentiellement régulatrice de *Sf-1*, localisée dans le 4^e intron, dont la chromatine est accessible spécifiquement à ce stade de développement (*Figure 1A*). Nous avons également montré que cette région est transitoirement mobilisée, *in vivo*, au cours de l'ontogenèse hypophysaire, à E13,5 chez la souris [7]. La caractérisation des marques épigénétiques de la chromatine de cette région a montré qu'elle était un *enhancer* actif, que nous avons nommé « *enhancer* α », dans les cellules gonadotropes immatures. Afin de déterminer l'importance de cet *enhancer* dans la régulation de l'expression de

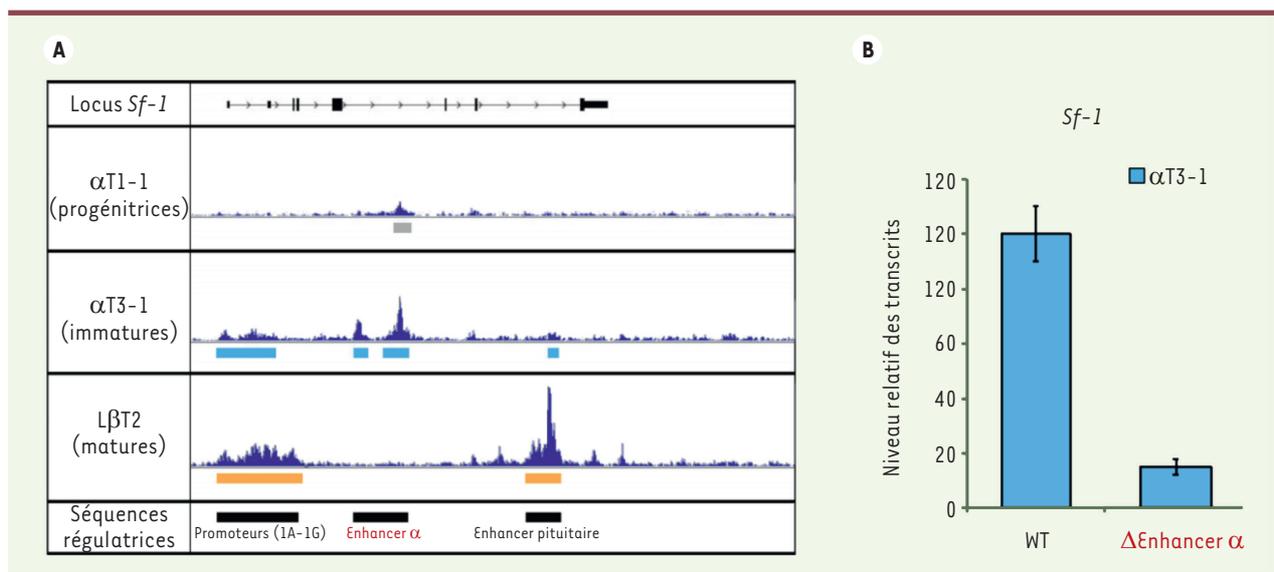


Figure 1. Identification de l'enhancer α , le plus précocement impliqué dans l'expression de *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire. **A.** « Accessibilité » de la chromatine mesurée par la technique ATAC-seq (*assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing*) pour le locus du gène *Sf-1* dans les trois lignées modèles de cellules gonadotropes murines immortalisées : α T1-1, α T3-1 et L β T2. La hauteur des pics reflète le « degré d'ouverture » de la chromatine. Les régions accessibles de la chromatine ainsi identifiées sont soulignées sous chacune des lignées cellulaires (respectivement en gris, bleu, et jaune). La dernière ligne récapitule, en noir, l'ensemble des régions accessibles de la chromatine identifiées pour l'ensemble des lignées. **B.** Niveaux relatifs des transcrits de *Sf-1* dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1 témoins (*wild-type*, WT) ou ayant subi la délétion de l'enhancer α (Δ Enhancer α) mesurés par RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) après normalisation par le taux de transcrits d'un gène de ménage (*Gapdh*, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Les données correspondent à la moyenne \pm SEM (*standard error of the mean*, ou erreur type de la moyenne) de six expériences indépendantes. Différence statistiquement significative par rapport aux cellules témoins (WT) : $p < 0,001$.

Sf-1, nous avons réalisé la délétion de sa séquence génomique dans les cellules gonadotropes immatures par la technique CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*). La délétion de cette séquence entraîne une réduction majeure de l'expression de *Sf-1*, ce qui montre que cet enhancer est très important pour l'expression de *Sf-1* dans les cellules gonadotropes immatures (Figure 1B). Il s'agit de l'enhancer le plus précocement impliqué dans le contrôle de l'expression du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope, et dont le recrutement précède celui de l'enhancer pituitaire [5].

Quels sont les mécanismes épigénétiques contrôlant l'activité de l'enhancer α du gène *Sf-1* ?

L'analyse bio-informatique de la séquence génomique de cet enhancer a révélé un

site de fixation de type ERE (*estrogen response element*) très conservé chez les mammifères. Nous avons déterminé que seul le récepteur α des œstrogènes (ER α) est exprimé dans les cellules gonadotropes immatures et vérifié, par immunoprécipitation de la chromatine, qu'il se fixait effectivement sur cet enhancer (Figure 2A). Nous avons par ailleurs montré que ER α est un facteur de transcription indispensable à l'activité de l'enhancer α puisque la diminution de son expression par des ARN interférents inactive totalement cet enhancer. De plus, nous avons mis en évidence, par des approches pharmacologiques, que l'action de ER α est dépendante de l'activation par son ligand, l'œstradiol [7].

L'excision de l'ERE de l'enhancer α dans des cellules gonadotropes immatures par la stratégie CRISPR/Cas9 bloque la fixation de ER α sur cet enhancer, et nous avons montré que cette fixation est strictement

nécessaire au maintien de l'expression de *Sf-1* par le biais d'un remodelage important des marques épigénétiques de la chromatine (Figure 2B). Lorsque ER α ne peut plus se fixer sur l'enhancer α , on observe notamment la fermeture de la chromatine à cet emplacement, ainsi que la reméthylation totale de l'ensemble des sites cytosine-phosphate-guanine (CpG) de l'ADN, suggérant une inactivation complète de cet enhancer (Figure 2C). Parallèlement à ces modifications, nous avons mis en évidence une nette diminution de la fixation de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène *Sf-1* (Figure 2D), attestant l'effet régulateur, à distance, de l'enhancer α sur l'expression de ce gène.

Conclusion

Cette étude nous a permis d'identifier l'enhancer le plus précocement impliqué dans l'activation du gène *Sf-1* au cours de la spécification du lignage gonado-

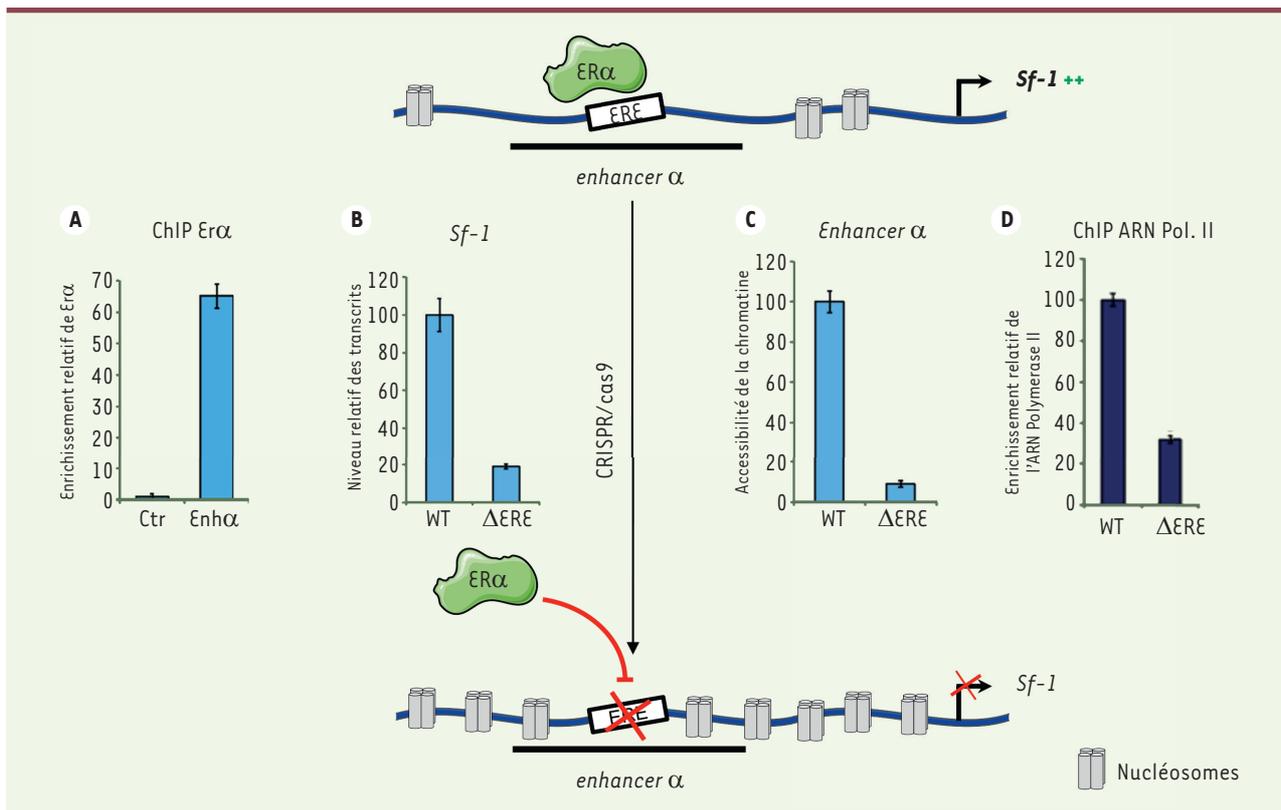


Figure 2. ERα est essentiel aux mécanismes épigénétiques contrôlant l'expression du gène Sf-1 dans les cellules gonadotropes immatures. **A.** Enrichissement relatif de ERα sur l'enhancer α (Enhα), déterminé par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) suivie d'une PCR quantitative (*polymerase chain reaction*) dans les cellules gonadotropes immatures αT3-1. Chaque valeur correspond à la moyenne ± SEM (erreur type de la moyenne) de quatre expériences indépendantes. Différence statistiquement significative par rapport à l'enrichissement sur une région chromatinienne témoin (*control*, Ctr) : $p < 0,001$. **B.** Niveau relatif des transcrits du gène Sf-1 dans les cellules gonadotropes immatures αT3-1 témoins (*wild-type*, WT) ou délétées pour l'ERE identifié dans la séquence de l'enhancer α (ΔERE), obtenu par RT (*reverse transcriptase*)-PCR et normalisation par le taux de transcrits d'un gène de ménage (*Gapdh*, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Les données correspondent à la moyenne ± SEM de six expériences indépendantes. Différence statistiquement significative par rapport aux cellules témoins (WT) : $p < 0,001$. **C.** Accessibilité de la chromatine de l'enhancer α mesurée dans les cellules gonadotropes immatures αT3-1 WT ou ΔERE par PCR quantitative, exprimée par rapport aux cellules WT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± SEM de quatre expériences indépendantes. Différence statistiquement significative par rapport aux cellules WT : $p < 0,001$. **D.** Enrichissement relatif de l'ARN polymérase II (ARN Pol. II) sur le promoteur pituitaire de Sf-1, mesuré par ChIP-PCR quantitative dans les cellules gonadotropes immatures αT3-1 WT et ΔERE, exprimé par rapport aux cellules WT. Chaque valeur correspond à la moyenne ± SEM de six expériences indépendantes. Différence statistiquement significative par rapport aux cellules WT : $p < 0,001$.

trope dans l'hypophyse. Elle a également permis de découvrir le rôle essentiel du récepteur nucléaire des œstrogènes ERα dans le maintien des mécanismes épigénétiques impliqués dans l'expression de Sf-1 par les cellules gonadotropes immatures, un rôle qui s'inscrit dans le concept émergent de l'implication de ce facteur dans les processus épigénétiques de différenciation cellulaire. Une diminution de l'expression de ERα ou une altération de la signalisation œstrogénique, par exemple par des per-

turbateurs endocriniens, pourrait ainsi expliquer certains défauts précoces de la mise en place du lignage gonadotrope, conduisant à terme à des troubles de la reproduction chez l'adulte. ♦

ERα orchestrate epigenetic mechanisms initiating Sf-1 gene expression during pituitary gonadotrope cell lineage differentiation

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, et al. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 2302-12.
- Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, et al. Heterozygous missense mutations in *steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1)* are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 ; 92 : 991-9.
- Zhao L, Bakke M, Parker KL. Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 2001 ; 185 : 27-32.
- Kimura R, Yoshii H, Nomura M, et al. Identification of novel first exons in *Ad4BP/SF-1 (NR5A1)* gene and their tissue- and species-specific usage. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 278 : 63-71.

RÉFÉRENCES

5. Shima Y, Zubair M, Komatsu T, et al. Pituitary homeobox 2 regulates adrenal binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol* 2008 ; 22 : 1633-46.
6. Laverrière JN, L'Hôte D, Tabouy L, et al. Epigenetic regulation of alternative promoters and enhancers in progenitor, immature, and mature gonadotrope cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2016 ; 434 : 250-65.
7. Pacini V, Petit F, Quérat B, et al. Identification of a pituitary ER α -activated enhancer triggering the expression of Nr5a1, the earliest gonadotrope lineage-specific transcription factor. *Epigenet Chromatin* 2019 ; 12 : 48
8. Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 228 : 1-21.



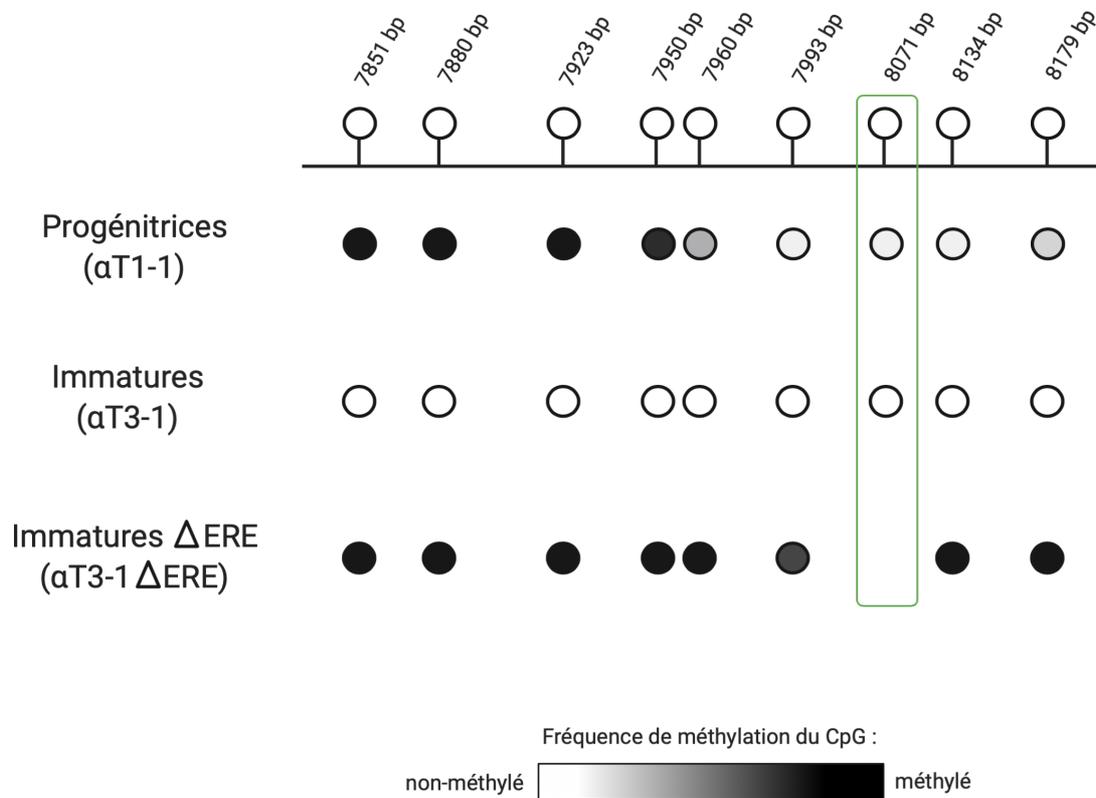


Figure 23. ER α est nécessaire pour le maintien de l'état d'hypométhylation des dinucléotides CpG de l'ADN de l'enhancer α de *Nr5a1*. Représentation bilan du statut de méthylation des dinucléotides CpG de l'enhancer α dans les cellules progénitrices (α T1-1), les cellules gonadotropes immatures *wild-type* (α T3-1) ou délétées pour l'ERE de l'enhancer α (α T3-1 Δ ERE). En haut est représenté la séquence de l'enhancer α et ses différents dinucléotides CpG (ronds blancs), localisés de façon relative par rapport au TSS du promoteur 1A de *Nr5a1*. Le dinucléotide entouré en vert est localisé dans la séquence ERE de l'enhancer α . Il est absent dans les cellules gonadotropes immatures délétées pour l'ERE (α T3-1 Δ ERE). Plus la couleur du rond est sombre, plus sa fréquence de méthylation était élevée (blanc : non méthylé, noir : méthylé). D'après les données de Pacini V, *et al.* 2019.

IV. RESULTATS NON PUBLIÉS. Caractérisation des mécanismes moléculaires activant l'enhancer α de Nr5a1 dans les cellules gonadotropes hypophysaires.

Introduction :

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction du manuscrit (§1.4), ER α seul ne peut pas activer un *enhancer* inactif. Il doit y être recruté par un FP puis, dans un second temps, y recruter lui-même des co-activateurs qui permettront le regroupement optimal de complexes/enzymes de remodelage de la chromatine comme l'acétyltransférase P300. Dans notre article, nous avons montré qu'ER α se fixe sur l'*enhancer* α dans les cellules gonadotropes immatures et que cette fixation est corrélée avec la présence de P300 et le dépôt de H3K27ac. Dans les cellules progénitrices, nous avons néanmoins pu détecter une liaison faible mais significative d'ER α et de P300 sur l'*enhancer*, cohérente avec un léger dépôt de la marque H3K27ac et une accessibilité très modérée de la chromatine (Figure 1-2 et supplémentaire 4 de l'article). L'*enhancer* est cependant hyperméthylé dans ces cellules (Figure 3 de l'article), suggérant qu'il serait dans un état de pré-activation (*primed*). De façon intéressante, l'état de méthylation des CpG de l'*enhancer* α dans les cellules progénitrices suggère, lui-même, un état « *primed* ». En effet, l'hyperméthylation n'est pas totale et certains CpG, situés autour de l'ERE, sont même hypométhylés alors que l'inhibition de la fixation d'ER α sur l'ERE dans les cellules gonadotropes immatures conduisait à la méthylation de tous les CpG, y compris ceux autour de l'ERE (Figure 5 de l'article et Figure 23). L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le FP est déjà exprimé dans les précurseurs des gonadotropes mais qu'il y manquerait un ou plusieurs co-activateurs nécessaires à l'amplification du remodelage épigénétique, de l'activation de l'*enhancer* α et *in fine* de l'expression de Nr5a1.

J'ai donc souhaité mieux comprendre les mécanismes moléculaires nécessaires à l'activation de l'*enhancer* au moment de la spécification gonadotrope. Pour ce faire, j'ai mis en place une première approche classique étudiant, avec un système de gène rapporteur luciférase, les effets de délétions ou de mutations de l'*enhancer* α sur son activité.

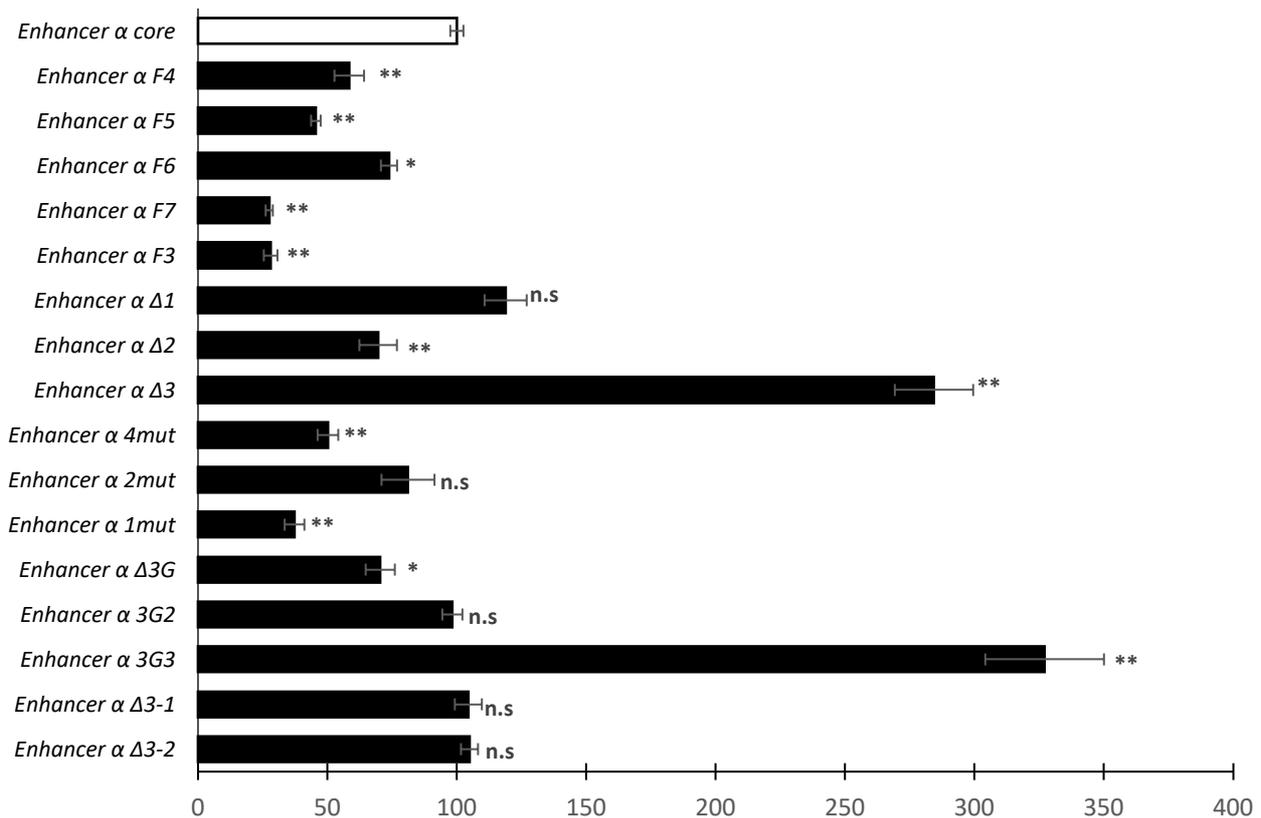
A**B**

Figure 24. Analyse de l'effet des différentes délétions et mutations de la séquence de l'enhancer α sur son activité.

A. Représentation des différentes séquences de l'enhancer α clonées dans les vecteurs luciférase. Les délétions et mutations de l'enhancer ont toutes été réalisées à partir de la séquence de l'Enhancer α core. Les nucléotides verts sont ceux conservés chez les mammifères placentaires. Les nucléotides rouges représentent les mutations de la séquence de l'enhancer. En haut de ces représentations sont indiqués les sites de fixation potentiels pour les familles de facteurs de transcription PAX, GATA et KLF, qui ont été identifiés avec l'outil bio-informatique en ligne CisBP. **B.** Activité luciférase des différentes constructions de l'enhancer α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1. L'activité luciférase relative a été mesurée comme indiqué dans le Matériel et Méthodes. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes réalisées en quadruplicat. Les données ont été analysées par le test ANOVA suivi d'une comparaison multiple de *Dunnett*. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ versus l'activité de la construction Enhancer α core, définie comme 100.

Partie 1. Étude en système rapporteur des conséquences de délétions ou mutations de l'*enhancer* α sur son activité *trans*-activatrice

Comme nous avons pu le montrer dans notre travail publié dans *Epigenetics & Chromatin*, la totalité de l'activité *trans*-activatrice de l'*enhancer* α dépend d'un fragment de 61 bp qui constitue le « *core enhancer* ». Ce fragment, qui a une séquence conservée chez les mammifères, comporte un ERE qui montre une conservation évolutive quasi parfaite. Au-delà de ce fragment, la conservation, bien que plus faible, reste significative. L'existence de ces positions conservées en dehors de l'ERE suggère une contrainte évolutive et donc possiblement leur capacité à fixer des facteurs importants pour la régulation de l'*enhancer*. On peut noter toutefois que le fragment considéré est de très petite taille et donc que la probabilité de recombinaison homologue entre une position conservée et l'ERE est extrêmement faible. Il est donc possible que leur conservation soit une conséquence fortuite de la forte conservation de l'ERE et du déséquilibre de liaison (phénomène d'auto-stop génétique ; Barton N H, 2000).

Afin d'étudier l'importance de ces séquences conservées dans l'activité de l'*enhancer*, j'ai analysé, dans un premier temps, l'ensemble des sites de fixation potentiels pour des FT au sein du *core enhancer* à l'aide du programme en ligne CisBP (Weirauch M T, *et al.* 2014). Cette analyse nous a permis d'identifier 16 sites potentiels en plus de l'ERE, réunis en deux ensembles : ceux situés entre les bases 1 et 19, d'une part, et ceux répartis entre les bases 24 et 43 (très proche de l'ERE), d'autre part. Le second groupe se superpose à une partie plus conservée du *core enhancer* (Figure 24A). Quelques-uns de ces sites potentiels de fixation sont particulièrement intéressants comme par exemple ceux liant des FT membres des familles KLF (*Kruppel Like Factor*), PAX et GATA, tous comprenant un FP déjà identifié (KL4, Soufi A, *et al.* 2012 ; PAX7, Meyran A, *et al.* 2018 ; et GATA3, Tanaka H, *et al.* 2020). Dans un premier temps, j'ai créé un panel de délétions et de mutations (Figure 24A) permettant d'abolir ces sites et j'ai testé les effets de ces modifications sur l'activité *trans*-activatrice de l'*enhancer* en système rapporteur dans la lignée gonadotrope immature α T3-1 (Figure 24B).

Comme on peut le voir sur la Figure 24B, certaines délétions diminuent l'activité *trans*-activatrice de l'*enhancer* (comme, par exemple, les délétions des séquences de 8 et 16 bp de la partie 5', respectivement pour les constructions *Enhancer* α F4 et F5) alors que d'autres sont sans effet (comme la délétion *Enhancer* α Δ 1 (10-19 pb) ou encore la délétion Δ 3 (28-38 pb)). Cependant il est très difficile de faire émerger un modèle simple de fonctionnement de l'*enhancer* à partir de ces données qui sont parfois contradictoires. En effet, la délétion de la

partie conservée $\Delta 3$ (28-38 pb), par exemple, augmente très fortement l'activité *trans*-activatrice alors que, paradoxalement, la mutation des 4 bases conservées de cette région (construction *Enhancer* α 4 mut) diminue de façon significative son activité.

Cette approche ne m'aura donc pas permis d'identifier sans ambiguïté le ou les sites de fixation de FT nécessaires à l'activité de l'*enhancer*. Ceci s'explique probablement par au moins deux raisons : 1) muter ou déléter une séquence peut avoir des effets secondaires inattendus comme celles de créer un site de fixation pour un FT, ou encore, de modifier l'activité de la région *cis*-régulatrice en changeant sa taille. De tels effets ont été souvent observés dans les études de promoteur utilisant ces approches, notamment dans les études menées au laboratoire sur le promoteur du *Gnrhr*. 2) La seconde raison réside dans la différence de structure entre l'*enhancer* génomique (au sein du locus de *Nr5a1*) et l'*enhancer* épisomique (dans le vecteur contenant le gène luciférase). La bibliographie sur la structure chromatinienne des épisomes, bien que pauvre et ambiguë, suggère que les vecteurs transfectés, ou épisomes, ne présentent pas une garniture chromatinienne comparable à celle retrouvée sur le locus génomique endogène d'une même séquence. Celle-ci serait en effet soit absente soit très anormale (Jeong S et Stein A, 1994 ; Mladenova V, *et al.* 2009). Cette différence est particulièrement problématique pour notre questionnement qui est d'identifier le FP permettant le recrutement d'ER α sur l'*enhancer* dans un contexte chromatinien contraint. Le contexte d'épisome qui permet un libre accès d'ER α à l'*enhancer*, sans nécessité de FP, n'est donc très probablement pas le modèle le mieux adapté pour identifier des sites de fixation de facteurs, pionniers ou co-activateurs, nécessaires à l'action d'ER α .

J'ai donc choisi de développer une autre approche, combinant la caractérisation des sites de fixation d'ER α sur le génome des cellules gonadotropes immatures et l'identification des partenaires protéiques d'ER α .

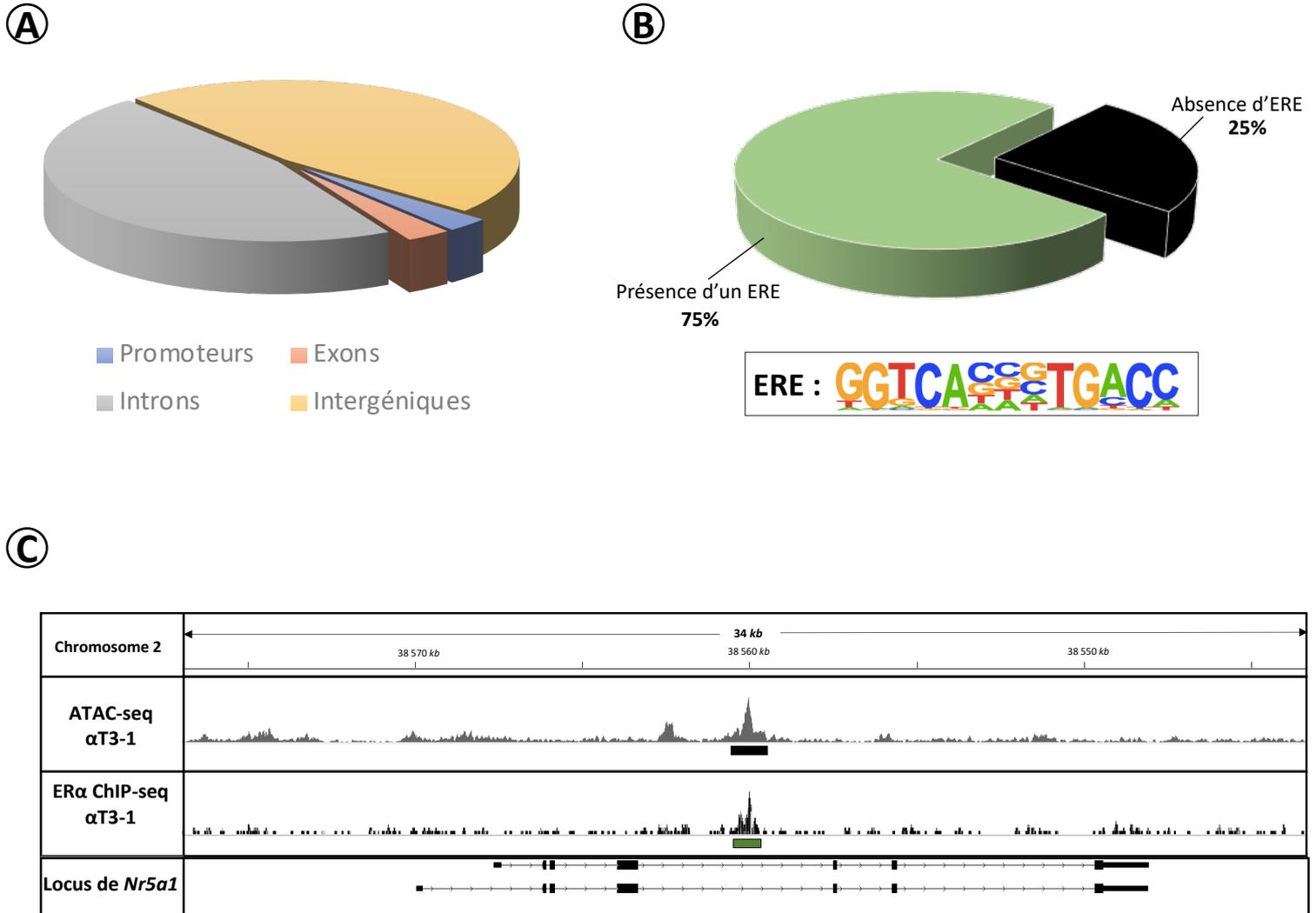


Figure 25. Identification et analyse des différents sites de fixation d'ERα (cistrome) dans les cellules gonadotropes immatures αT3-1. **A.** Répartition des différents sites de fixation d'ERα sur le génome de souris. Ces sites sont localisés sur des séquences promotrices, exoniques, introniques ou intergéniques. **B.** Proportion des sites de fixation d'ERα possédant un ERE (*estrogen response element*). Dans l'encadré est indiqué le motif ERE canonique identifié chez la souris. **C.** Résultats d'accessibilité de la chromatine (ATAC-seq) et de la fixation d'ERα (ChIP-seq) dans les cellules gonadotropes immatures αT3-1. Les résultats visualisés avec le logiciel IGV correspondent à 34 kbp du locus de *Nr5a1*. Seule la région de l'*enhancer α* est représentée par une barre noire sous les données d'ATAC-seq (pour l'ensemble des données d'accessibilité de la chromatine, voir Pacini V, *et al.* 2019). La fixation d'ERα sur le locus de *Nr5a1* est identifiée par une barre verte sous les données de ChIP-seq.

Partie 2. Identification du cistrome d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1.

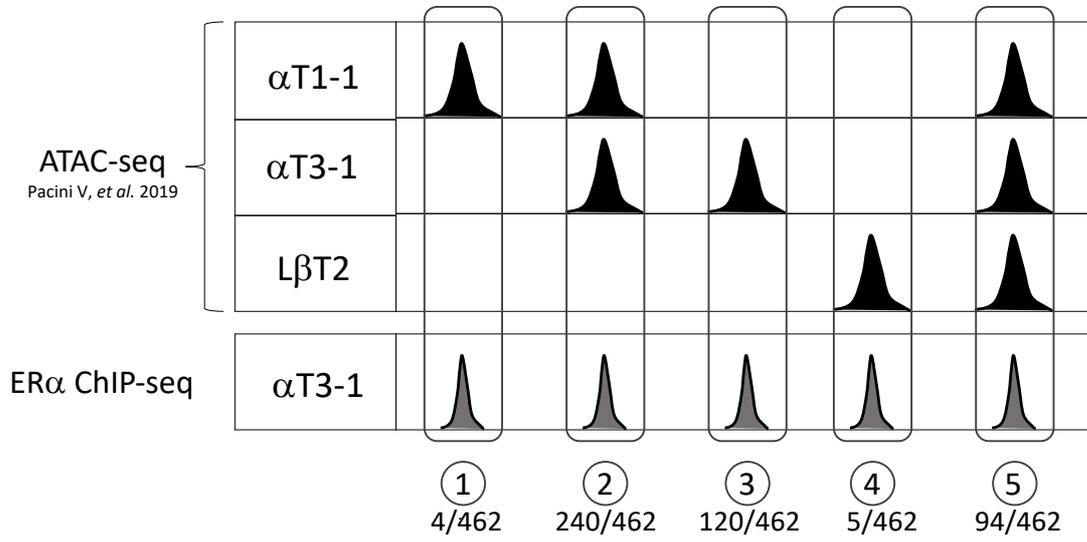
Notre choix de rechercher les FT, et notamment le FP, nécessaires à l'action d'ER α en caractérisant le cistrome d'ER α était basé sur l'hypothèse suivante : si un co-facteur de type FP est nécessaire à l'action d'ER α dans les cellules gonadotropes, il recrute très probablement le récepteur non seulement sur l'*enhancer* α de *Nr5a1*, mais aussi sur de nombreuses autres séquences *cis*-régulatrices de type *enhancer*. Une fraction substantielle des *enhancers* cibles d'ER α devrait donc être enrichis en motifs ERE mais aussi en motifs susceptibles de lier le FP. A l'appui de cette hypothèse, la caractérisation du cistrome d'ER α dans différents tissus et notamment dans la glande mammaire, a mis en évidence que les *enhancers* sont enrichis spécifiquement en sites de fixation de type *Forkhead*, signatures de la fixation du facteur pionnier FOXA1. J'ai donc analysé le cistrome d'ER α dans les cellules α T3-1 par immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage haut-débit.

Après analyse bio-informatique, en utilisant la suite d'algorithme Homer (<http://homer.ucsd.edu/homer/>), j'ai identifié 674 séquences de fixation d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1. Ces sites sont à proximité de 615 gènes différents suggérant que quelques-uns de ces gènes puissent être associés à plusieurs régions cibles ou que les régions cibles contrôlent des gènes situés à plus grande distance. L'analyse bibliographique des résultats similaires obtenus dans d'autres types cellulaires, par exemple, pour 7 cistromes étudiés dans différents tissus (Stender J D, *et al.* 2010 ; Cicatiello L, *et al.* 2010 ; Ross-Innes C S, *et al.* 2010 ; Palaniappan M, *et al.* 2019 ; Zhang Y, *et al.* 2020 ; Takaku M, *et al.* 2020 ; Raut S, *et al.* 2020), le nombre de sites d'ER α varie de 947 à 21 221. Notre résultat s'inscrit donc plutôt dans une fourchette basse ce qui peut s'expliquer par le fait que nous n'avons retenu que les régions cibles très significativement enrichies dans l'immunoprécipitat et éliminé les régions de faibles enrichissements.

L'analyse de la localisation des différents sites de fixation d'ER α sur le génome révèle que plus de 97% d'entre eux sont localisés à distance des régions promotrices, dans des régions intergéniques, introniques ou exoniques du génome (Figure 25A). Ces résultats sont en accord avec différentes études montrant qu'ER α , pour réguler ses gènes cibles, se fixe majoritairement sur les séquences *cis*-régulatrices distales de type *enhancer* et non sur les promoteurs (Carroll J S, *et al.* 2006 ; Lin C-Y, *et al.* 2007 ; Palaniappan M, *et al.* 2019).

La recherche, par analyse bio-informatique, de motifs enrichis dans le cistrome en utilisant l'algorithme *findmotif* de la suite HOMER a mis en évidence que près de 75% de ces séquences

A



B

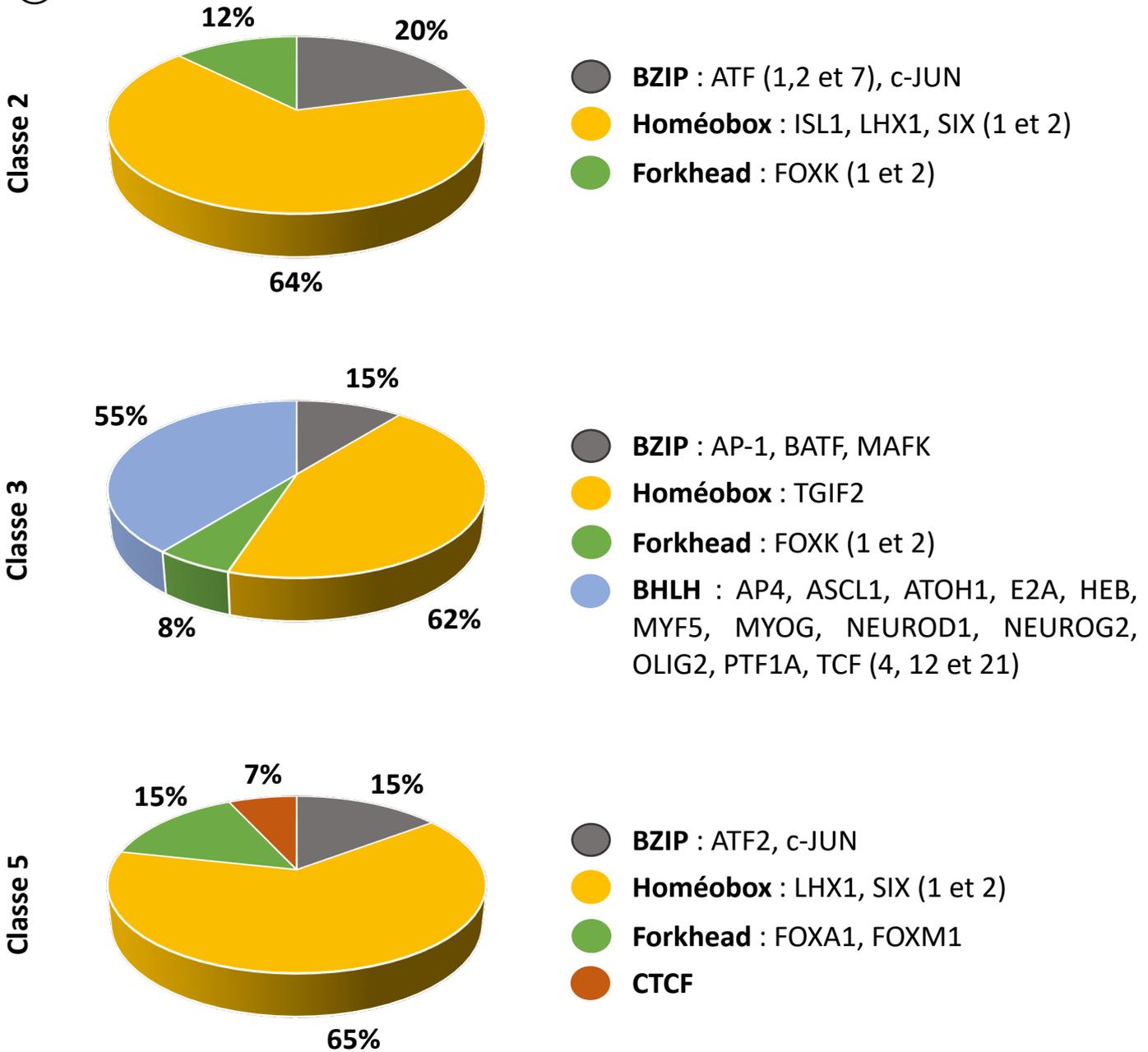


Figure 26. Analyse de l'enrichissement en sites de fixation pour des facteurs de transcription sur les différentes classes du *cistrome* d'ERα. **A.** L'analyse du *cistrome* d'ERα, conjointement avec les données d'ATAC-seq obtenues dans les trois lignées modèles de cellules gonadotropes murines (Pacini V, *et al.* 2019), nous a permis de distinguer différentes classes de séquences : certaines séquences cibles d'ERα possédant un ERE sont ouvertes spécifiquement dans les cellules progénitrices (1), à la fois dans les cellules progénitrices et gonadotropes immatures (2), dans les cellules gonadotropes immatures (3), dans les cellules gonadotropes matures (4), ou dans les trois lignées cellulaires (5). La proportion de séquences correspondantes est indiquée sous chacune de ces classes. **B.** Analyse de l'enrichissement en sites de fixation à proximité des séquences ERE dans les classes 2, 3 et 5. Les pourcentages de séquences détenant un site de fixation pour l'une de ces familles de facteurs de transcription et les facteurs de transcription associés prédits sont indiqués.

possèdent au moins un site de fixation ERE pour les récepteurs des œstrogènes (Figure 25B). Cela suggère donc que l'action d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures s'effectue majoritairement par liaison directe sur un ERE. ER α se fixerait sur les autres séquences cibles indirectement par l'intermédiaire d'un co-facteur comme cela a déjà été décrit avec AP-1 (Safe S et Kim K, 2008). La recherche de motifs enrichis dans les séquences cibles d'ER α ne présentant pas d'ERE ne montre aucun enrichissement significatif en motifs connus, ce qui ne permet pas de faire des hypothèses sur le mécanisme d'activation de ces *enhancers*.

J'ai choisi de me concentrer sur les régions cibles contenant un ERE, ce qui représente environ 462 régions. Comme la lignée α T1-1 exprime aussi ER α contrairement à la lignée L β T2, il était à priori possible qu'une partie de ces régions soient déjà mobilisées dans les cellules progénitrices. J'ai donc utilisé les résultats d'accessibilité de la chromatine obtenus par l'analyse d'ATAC-seq dans les trois lignées cellulaires, afin de classer les différentes régions selon leur accessibilité dans ces différents modèles. J'ai ainsi pu distinguer 5 classes différentes au sein de ses régions (Figure 26A) :

- Classe 1) Les régions présentant une accessibilité chromatinienne exclusivement dans la lignée progénitrice α T1-1 (seulement 4 régions sur 462). Le nombre de ces régions étant très faible, j'ai choisi de ne pas effectuer des analyses plus poussées.

- Classe 2) Les régions présentant une accessibilité chromatinienne à la fois dans la lignée α T1-1 et dans la lignée α T3-1 (240 régions sur 462). Elles représentent environ la moitié (52 %) du cistrome, de façon cohérente avec le fait qu'ER α est exprimé à la fois par les cellules progénitrices et les gonadotropes immatures. L'existence de cette classe suggère que les mécanismes permettant à ER α d'activer ces régions cibles sont déjà à l'œuvre au stade progéniteur. Il est intéressant de souligner que l'*enhancer* α de *Nr5a1* appartient à cette classe de région, en cohérence avec les résultats que j'ai décrit précédemment (Figure 25C). L'analyse en *clustering* fonctionnel des gènes à proximité de ces régions montrent un enrichissement pour les voies de signalisation de la prolactine et de l'ocytocine, les deux voies étant connues pour être actives dans la lignée α T3-1 (Evans J J, *et al.* 1997 ; Henderson H L, *et al.* 2008). On peut aussi noter un enrichissement en gènes qualifiés de « *positive regulation of transcription by RNA polymerase II* » suggérant une importance fonctionnelle particulière de ces *enhancers* dans la différenciation précoce du lignage gonadotrope.

- Classe 3) Les régions présentant une accessibilité chromatinienne exclusivement dans la lignée α T3-1 (120 régions sur 462). Elles constituent environ 26 % du cistrome. L'existence de cette classe suggère qu'il existe des mécanismes d'activation propres aux cellules gonadotropes immatures, et donc distincts de ceux des régions cibles d'ER α de la classe 2. L'analyse en *clustering* fonctionnel des gènes à proximité de ces régions ne fait cependant pas ressortir de catégories fonctionnelles particulièrement pertinentes.

- Classe 4) Les régions présentant une accessibilité chromatinienne exclusivement dans la lignée L β T2 (5 régions sur 462). Ces 5 petites séquences contenant un ERE sont en fait très proches, regroupées dans le génome et forment une région de grande taille, de 700 bp, localisée dans l'intron 3 du gène *Macrodl* (*Mono-ADP Ribosylhydrolase 1*). Le fait qu'ER α se fixe sur cette région dans les cellules immatures est surprenant car les données d'ATAC-seq montrent sans ambiguïté qu'elle n'est accessible que dans la lignée L β T2. Le promoteur de ce gène est lui accessible dans les trois lignées, suggérant que ce gène s'exprime aux trois stades de la différenciation gonadotrope. Ceci est confirmé par les données de RNA-seq produites par le laboratoire du Pr P. Mellon (Xie H, *et al.* 2017, GEO Accession : GSE104513) qui suggèrent, de plus, une expression préférentielle dans la lignée α T3-1. De façon intéressante, l'expression du gène *Macrodl* est connue pour être activée par l'œstradiol *via* ER α (Han W-D, *et al.* 2003 ; Meng Y G, *et al.* 2007) et le produit de ce gène, LRP16, est un co-activateur d'ER α (Han W-D, *et al.* 2007). Le fait qu'ER α se fixe que cette région malgré un contexte chromatinien défavorable pourrait s'expliquer par le nombre important d'ERE situés dans cette région.

- Classe 5) Sont regroupées dans cette classe les régions présentant une accessibilité chromatinienne dans les trois lignées (94 régions sur 462) représentant 20 % du cistrome d'ER α . L'analyse en *clustering* fonctionnel des gènes à proximité de ces régions ne fait pas ressortir de catégories fonctionnelles particulièrement intéressantes.

Afin d'identifier des facteurs potentiellement impliqués dans le recrutement d'ER α sur les séquences *cis*-régulatrices, j'ai effectué une recherche de motifs de FT situés à proximité des ERE des différentes classes 2, 3 et 5. Les régions des classes 1 et 4 n'étaient pas assez nombreuses pour permettre une analyse fiable (Figure 26B). J'ai effectué cette recherche dans les 100 bp autour de l'ERE afin de ne retenir que ceux susceptibles de participer directement au recrutement d'ER α . Quelle que soit la classe, nous avons retrouvé, comme attendu au vu du filtre appliqué initialement, un enrichissement important en séquences ERE ou apparentées.

- Dans les régions de la classe 2, accessibles en α T1-1 et α T3-1, on trouve des sites pour les facteurs de la famille bZIP (ATF1, ATF2, ATF7, c-Jun) dans environ 20 % des régions cibles d'ER α , de la famille des Forkheads (FOXK1 et FOXK2) dans environ 12 % des cibles et de la famille des Homeobox (SIX1 et SIX2, par exemple) dans environ 60 % des cibles. Parmi ces facteurs Homeobox, deux sites de protéines à domaine LIM, LHX1 et ISL1, sont retrouvées dans environ 20 % des séquences cibles d'ER α . Les données transcriptomiques révèlent que des membres de ces différentes familles de FT sont exprimés dans les deux lignées α T1-1 et α T3-1. De façon intéressante, ISL1 a été récemment proposé pour être un FP du lignage des cardiomyocytes (Gao R, *et al.* 2019) et notre laboratoire a montré qu'il est impliqué dans la régulation du promoteur du gène *Gnrhr* (Shang A-L, *et al.* 2013), faisant d'ISL1 un FP potentiel particulièrement intéressant pour la transition progéniteur-gonadotrope immature.

- Dans les régions cibles de la classe 3, accessibles spécifiquement dans les cellules α T3-1, les motifs de type *bZIP*, *Forkheads* et *Homeobox* sont légèrement moins enrichis que dans la classe 2. On trouve, en revanche, un enrichissement significatif pour les sites de fixation des protéines de la famille des *bHLH* et notamment ceux de la sous famille des NEUROD/G retrouvés dans près de 28 % des séquences cibles d'ER α . De façon intéressante, les données de transcriptomique indiquent que les deux facteurs NEUROD1 et NEUROD4 auraient une expression préférentielle au stade gonadotrope immature. NEUROD1 a été proposé comme étant un FP au cours de la différenciation neuronale (Matsuda T, *et al.* 2019). Il a été impliqué dans la régulation de l'expression du gène *Gnrhr* dans les cellules α T3-1 (Cherrington B D, *et al.* 2008). Enfin, la triple invalidation chez la souris de *Neurod1*, *Neurod4* et d'un autre FT de la famille bHLH, *Ascl1* (*Achaete-Scute Family Bhlh Transcription Factor 1*), provoque une diminution drastique des lignages somatotropes, corticotropes et gonadotropes accompagnée d'une augmentation du lignage lactotrope (Ando M, *et al.* 2018). Toutes ces données suggèrent que les deux facteurs NEUROD1 et NEUROD4 pourraient être de potentiel FP du lignage gonadotrope immature.

- Enfin, les régions cibles de la classe 5, accessibles spécifiquement dans les trois lignées cellulaires α T1-1, α T3-1 et L β T2, présentent des enrichissements de motifs globalement similaires à ceux observés pour la classe 2, avec l'absence notable toutefois de l'enrichissement significatif pour ISL1 et un enrichissement modéré pour le facteur CTCF, souvent associé aux *insulators*. Ces résultats suggèrent que les régions de cette classe ne seraient pas spécifiquement impliquées dans le devenir gonadotrope (Figure 27B).

L'analyse du cistrome d'ER α dans les cellules α T3-1 nous a donc permis de proposer au moins deux FP candidats agissant à deux étapes distinctes de la différenciation précoce. Le premier, ISL1, agirait notamment pendant la transition progéniteur/gonadotrope immature puis le second, NEUROD1/4, agirait pendant le stade immature. La différenciation précoce du lignage gonadotrope serait donc un phénomène graduel au cours duquel des facteurs activeraient séquentiellement des jeux spécifiques de séquences *cis*-régulatrices. Ce modèle par étapes de différenciation a d'ailleurs déjà été proposé pour la différenciation globale de ce lignage qui, *in vivo*, se met en place en suivant des étapes distinctes ; l'expression de *Cga* avant 12,5 jpc, puis de *Nr5a1/Gnrhr* à 13,5 jpc, et enfin l'expression de *Lhb* et *Fshb* après 16,5 jpc (Rosenfeld M G, *et al.* 2000).

Partie 3. Identification des partenaires protéiques d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1.

1. Introduction

L'analyse du cistrome d'ER α dans le modèle de cellules gonadotropes immatures α T3-1 offre des pistes intéressantes pour mieux comprendre le rôle de ce facteur dans la différenciation du lignage et identifier un éventuel FP. Cependant, tous les sites de liaison de FT ne sont pas parfaitement identifiés par cette approche. De plus, la détection d'un enrichissement pour un site donné ne permet pas toujours d'identifier précisément le facteur susceptible de s'y fixer, notamment car des membres d'une même famille de FT peuvent partager la même séquence consensus. C'est le cas, par exemple, de la famille des bHLH qui compte plus de 100 facteurs reconnaissant des motifs très similaires, avec une séquence centrale du type CANNTG (Toledo-Ortiz G, *et al.* 2003). Ainsi, dans les cellules gonadotropes immatures, l'enrichissement que nous avons observé en sites de liaison des membres de la sous famille NEUROD/G, ne nous permet pas de déterminer quel facteur de cette sous famille des bHLH pourrait interagir avec ER α . Enfin, comme évoqué plus haut, il est fortement probable que l'activation de l'*enhancer* α se fasse en deux étapes : le recrutement d'ER α par un facteur pionnier dans les cellules progénitrices puis son activation par le recrutement secondaire d'un ou plusieurs co-activateurs dans les cellules gonadotropes immatures. Il est probable que cette seconde étape soit totalement indépendante de l'ADN, le ou les co-activateurs pouvant se fixer directement sur ER α , ce qui fait qu'ils ne seront pas identifiés par l'analyse du cistrome.

Pour progresser dans l'analyse des mécanismes épigénétiques d'action d'ER α dans le lignage gonadotrope, nous avons donc choisi de combiner l'analyse du cistrome avec celle des protéines interagissant avec ER α . L'identification des partenaires d'une protéine d'intérêt se fait classiquement par des méthodes comme le double hybride ou la co-immunoprécipitation suivie de l'analyse en spectrométrie de masse. Assez récemment, une nouvelle méthode est venue révolutionner l'identification des *interactomes* : le BioID (*proximity-dependent biotinylation identification*) et ses différentes variantes. Ces nouvelles technologies reposent sur l'identification par biotinylation des protéines se trouvant à proximité immédiate d'une protéine d'intérêt. Cette protéine d'intérêt est fusionnée à une biotine ligase, une enzyme qui catalyse l'ajout covalent d'une biotine sur les résidus lysines de protéines localisées dans un diamètre d'environ 10 nm (Kim D I, *et al.* 2014). Cette technique permet ainsi de marquer les complexes protéiques associés à une protéine donnée en biotinylant à la fois les partenaires protéiques

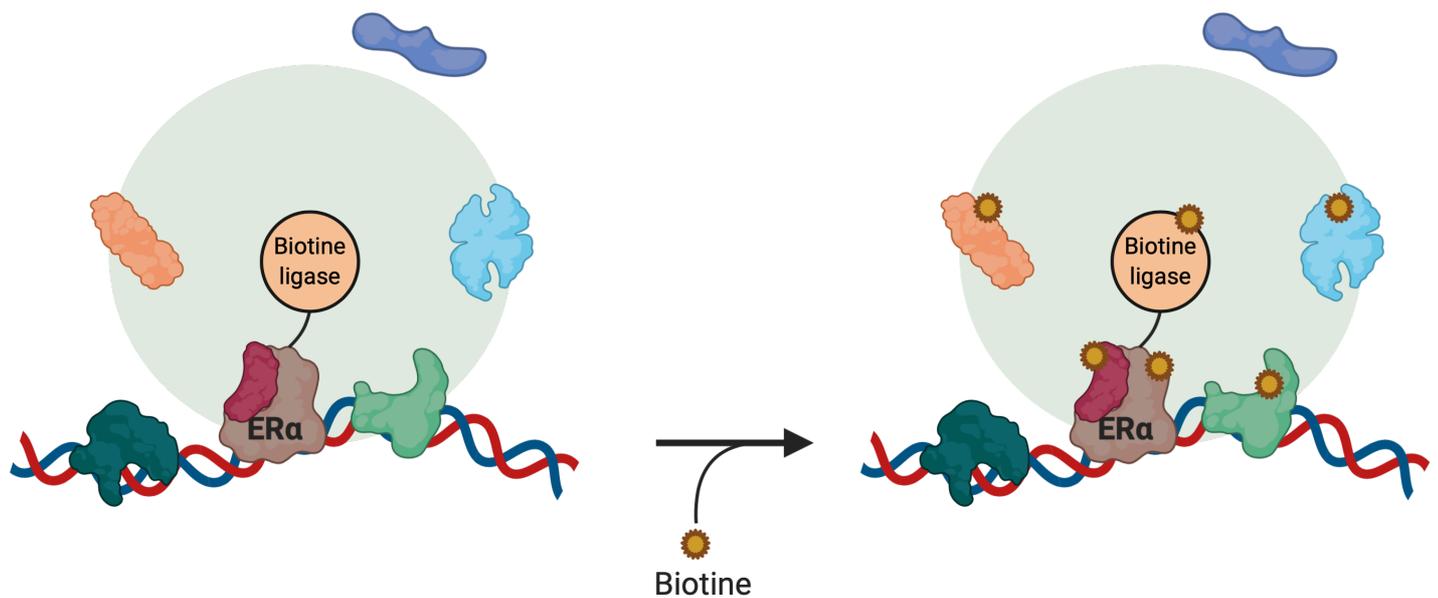


Figure 27. Schématisation de la technique d'identification des partenaires protéiques endogènes d'ER α par la stratégie de biotinylation proximale (BioID). Afin d'identifier l'environnement protéique d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1, nous avons généré des cellules sur-exprimant ER α fusionné à une enzyme de type *biotine ligase*. Ces deux protéines fusionnées sont espacées par une séquence *linker* flexible. En présence de son substrat, la biotine, la *biotine ligase* va entraîner le marquage des protéines avoisinantes dans un diamètre d'environ 10 nm (représenté par un cercle vert) par ajout covalent d'une biotine sur les résidus lysines des protéines. Cette stratégie permet ainsi d'identifier les partenaires protéiques directs ainsi que ceux situés à proximité immédiate.

directs, et ce que l'affinité soit forte, faible ou même transitoire, et certains des partenaires indirects, situés suffisamment à proximité (Figure 27). Les protéines biotinylées sont précipitées en utilisant des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Comme la liaison biotine/streptavidine est de très forte affinité, de l'ordre de celle d'une liaison covalente (Liu F, *et al.* 2016), la stringence des lavages peut être très importante ce qui réduit considérablement la précipitation de protéines non spécifiques et donc l'identification de faux positifs en spectrométrie de masse de type MS/MS.

2. Mise au point de la technique BioID et résultats

2.1 Établissement des clones stables

Afin de mettre au point la technique de BioID au laboratoire, j'ai généré des lignées stables de cellules gonadotropes immatures α T3-1 sur-exprimant ER α fusionné à une biotine ligase. La biotine ligase la plus utilisée est l'enzyme BirA d'*E. Coli*. Elle présente cependant quelques défauts : c'est une protéine relativement grosse, de 37 kDa (kilodaltons), assez mal traduite par les cellules eucaryotes et qui a une forte sensibilité vis-à-vis de son substrat, la biotine. Ceci la rend susceptible d'utiliser de façon non contrôlée la biotine endogène des cellules pour catalyser la réaction de marquage. Très récemment, fin 2018, une équipe américaine a optimisé de façon remarquable cette ligase et produit une version plus petite, de 28 kDa, nommée miniTurbo. Cette miniTurbo est non seulement mieux traduite en système eucaryote mais elle est aussi peu sensible aux faibles concentrations de biotine. Son activité n'est induite que par l'ajout de biotine à forte concentration (Branon T C, *et al.* 2018). J'ai donc choisi de fusionner ER α avec ce variant miniTurbo. De plus, des cellules gonadotropes immatures α T3-1 sur-exprimant la miniTurbo fusionnée à une séquence de localisation nucléaire (NLS) ont été utilisées comme contrôles afin d'identifier les éventuelles protéines biotinylées directement par la miniTurbo, indépendamment de leur interaction avec ER α .

J'ai cloné la séquence codante d'ER α (*Esr1*, *Estrogen Receptor 1*) ou d'une NLS en phase avec la séquence de la miniTurbo dans un vecteur d'expression pIRES-hygro. Afin de limiter les effets d'encombrement stérique dus à la fusion protéique sur l'identification des protéines et d'augmenter le diamètre d'action de la miniTurbo, j'ai espacé les deux protéines par l'ajout une séquence *linker* flexible de type [GGGGS]₃ (Chen X, *et al.* 2012 ; Kim D I, *et al.* 2016) (Figure 28A). Pour tenir compte d'éventuels effets de position de la fusion protéique sur l'identification des protéines, j'ai fusionné la miniTurbo en position N-terminale ou C-terminale d'ER α . J'ai

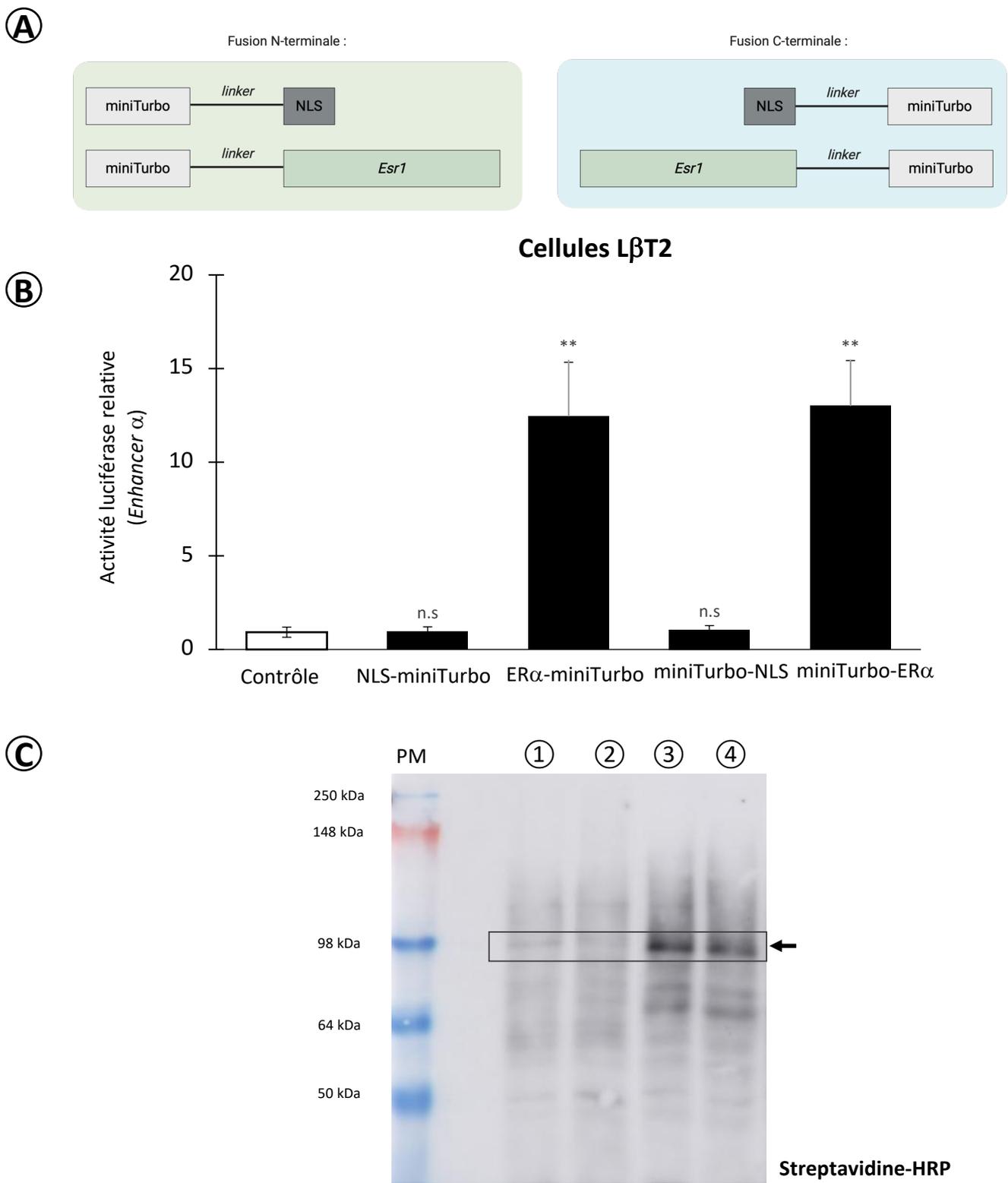


Figure 28. Élaboration de lignées cellulaires α T3-1 sur-exprimant ER α fusionné à la biotine ligase miniTurbo. **A.** Afin d'identifier les partenaires protéiques d'ER α , nous avons généré des cellules sur-exprimant ER α fusionné, en position N-terminale ou C-terminale, avec la miniTurbo. Pour cela, nous avons fusionné la séquence codante d'ER α (*Esr1*) avec celle de la miniTurbo, en les reliant avec une séquence *linker* flexible. Nous avons utilisé, comme contrôle de nos expériences, la séquence codante de la miniTurbo fusionnée, en position N-terminale ou C-terminale, à une séquence de localisation nucléaire (NLS). **B.** Nous avons vérifié la capacité *trans*-activatrice de ces constructions plasmidiques dans les cellules gonadotropes matures L β T2, n'exprimant pas ER α . Pour cela, nous avons co-transfecté le vecteur luciférase contenant la séquence de l'*enhancer* α avec les différents vecteurs d'expression de la miniTurbo fusionnés avec ER α ou la NLS. L'activité luciférase relative a été mesurée comme indiqué dans le Matériel et Méthodes. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes réalisées en quadruplicat. Les données ont été analysées par le test ANOVA suivi d'une comparaison multiple de *Dunnett*. **: $p < 0,01$ versus l'activité de la construction *Enhancer* α contrôle. **C.** La capacité de biotinylation des différentes lignées cellulaires α T3-1 a été testée. Les cellules ont été traitées avec 500 μ M de D-biotine pendant 18 heures, puis les protéines ont été extraites. Les extraits protéiques de chacune des lignées cellulaires ont été séparés sur un gel SDS-PAGE 10%. La biotinylation des protéines a été révélée par la streptavidine couplée à la HRP (*Horseradish peroxidase*). Ici sont présentés les profils de biotinylation pour les cellules exprimant les protéines de fusion NLS-miniTurbo (1), miniTurbo-NLS (2), ER α -miniTurbo (3) et miniTurbo-ER α (4). L'encadré marque la biotinylation de la construction ER α couplée à la miniTurbo (en position N-terminale ou C-terminale), dont le poids moléculaire est d'environ 95 kDa.

vérifié la capacité *trans*-activatrice de telles protéines de fusion en mesurant l'activité de l'*enhancer* α en système rapporteur luciférase dans les cellules gonadotropes matures L β T2. Ces cellules ont été choisies car elles n'expriment pas ER α et que l'*enhancer* α n'y est pas fonctionnel. J'ai ainsi pu vérifier que la fusion de la miniTurbo avec ER α ne perturbait pas la capacité *trans*-activatrice d'ER α et ce, que la fusion soit en position N ou C-terminale (Figure 28B).

J'ai ensuite transfecté les cellules α T3-1 par électroporation avec les différents vecteurs : pCMV-NLS-miniTurbo-IRES-hygro (protéine de fusion NLS-miniTurbo placée sous le contrôle du promoteur CMV dans le vecteur d'expression pIRES-hygro), pCMV-*Esr1*-miniTurbo-IRES-hygro (ER α -miniTurbo), pCMV-miniTurbo-NLS-IRES-hygro (miniTurbo-NLS), et pCMV-miniTurbo-*Esr1*-IRES-hygro (miniTurbo-ER α) puis j'ai cultivé les cellules dispersées sous hygromycine (100 μ g/mL) jusqu'à l'apparition de clones suffisamment gros pour être prélevés et isolés. Pour chaque construction, j'ai isolé plus de 10 clones que j'ai amplifiés et testés. Les tests reposaient sur la détection de l'activité de biotinylation de la miniTurbo. A cette fin, chaque clone était cultivé en présence de 500 μ M de D-Biotine pendant 18 heures puis des extraits protéiques de chacun des clones étaient séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines biotinylées ont ensuite été détectées à l'aide de streptavidine couplée à la peroxydase de Raifort (*Horseradish peroxidase*, HRP) (Figure 28C). L'ensemble des clones isolés présentait une activité de biotinylation, ce qui montre que la miniTurbo s'exprime de façon adéquate dans les cellules gonadotropes α T3-1. J'ai sélectionné un clone pour chacune des constructions d'après le profil de biotinylation. Pour les clones ER α -miniTurbo ou miniTurbo-ER α , j'ai choisi le clone présentant une protéine de fusion (ER α -miniTurbo ou miniTurbo-ER α) fortement auto-biotinylée se traduisant par une bande protéique importante à 95 kDa environ.

2.2 Marquage des protéines par la méthode SILAC

Afin de pouvoir comparer quantitativement les protéines identifiées avec les constructions ER α -miniTurbo et NLS-miniTurbo (ou miniTurbo-ER α et miniTurbo-NLS), j'ai couplé la stratégie de BioID à la technique de marquage des protéines par des acides aminés stables et isotopiquement modifiés, appelée *SILAC* (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, Itzhak D N, *et al.* 2019). Dans cette méthode, les cellules sont maintenues dans du milieu de culture contenant des acides aminés lysine et arginine non radioactifs stables et modifiés de

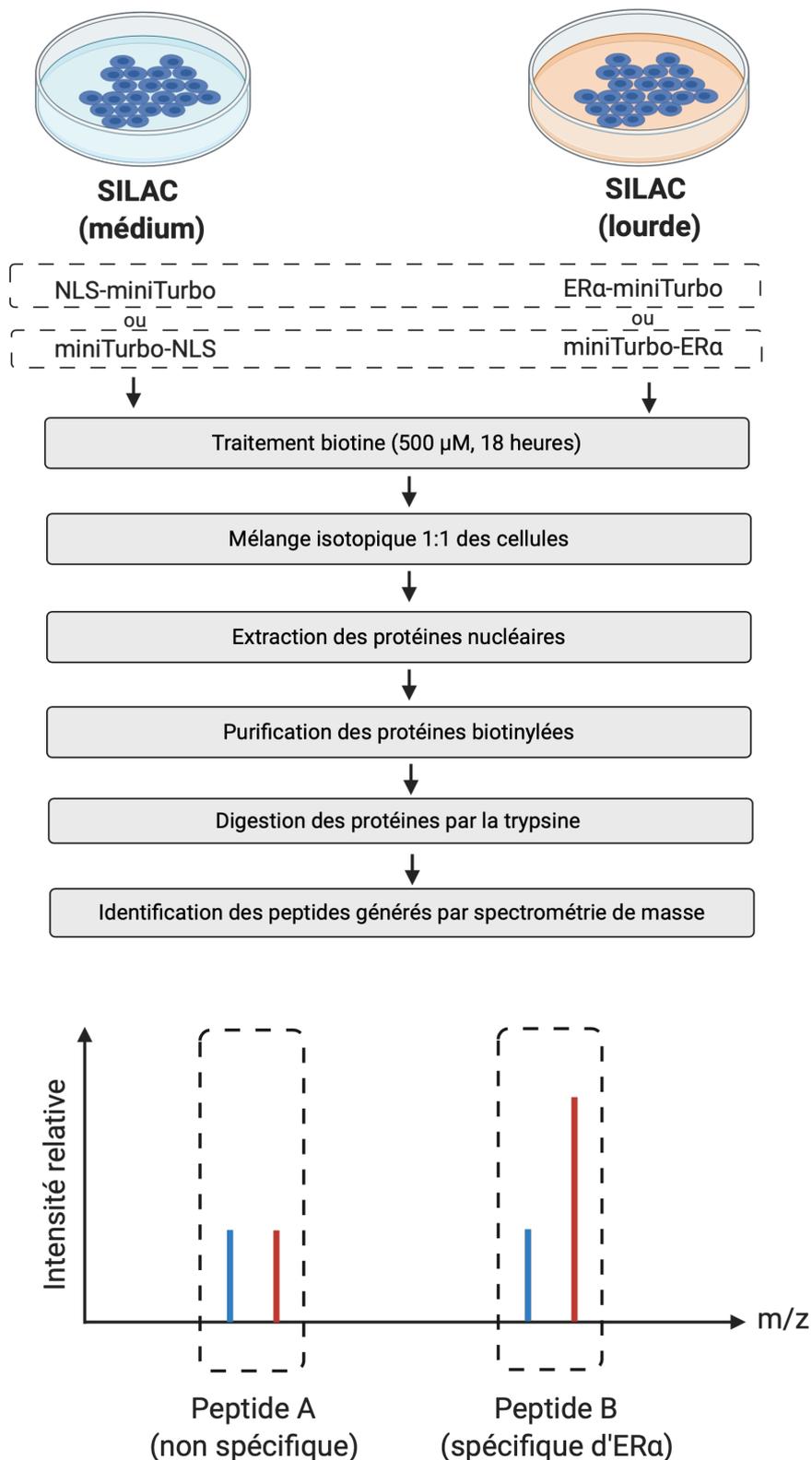


Figure 29. Mise en place expérimentale du marquage et de l'identification des protéines proches d'ER α par approche de BioID couplée à la stratégie de quantification SILAC. Les différentes lignées cellulaires générées pour la stratégie d'identification des protéines partenaires d'ER α par BioID ont été mises en culture dans des milieux de culture isotopiquement modifiés dits « médium » ou « lourde », respectivement pour les cellules contrôles (NLS-miniTurbo ou miniTurbo-NLS) et tests (ER α -miniTurbo ou miniTurbo-ER α). Les cellules dans leurs différents milieux ont été traitées avec 500 μ M de D-biotine pendant 18 heures, puis les lignées contrôles et tests correspondantes (NLS-miniTurbo/ER α -miniTurbo ou miniTurbo-NLS/miniTurbo-ER α) ont été mélangées selon le ratio 1:1. Les noyaux cellulaires ont été isolés puis les protéines nucléaires ont été extraites. Les protéines biotinyllées ont été purifiées, avant d'être digérées par la trypsine en peptides et identifiées par spectrométrie de masse. En bas sont représentés les résultats observés après identification par spectrométrie de masse. En bleu, les peptides identifiés pour la condition de culture de SILAC dit « médium », et en rouge, la condition « lourde ». Lorsque l'intensité d'identification est la même (exemple du peptide A), alors ce peptide ne sera pas considéré comme étant spécifique de ER α . En revanche, lorsque l'intensité d'identification d'un peptide sera deux fois plus élevée dans la condition « lourde » que « médium », la protéine correspondant à ce peptide sera identifiée comme étant un partenaire protéique direct ou indirects d'ER α .

façon isotopique. Ces acides aminés sont incorporés dans les protéines jusqu'à remplacement total des acides aminés « naturels ». Le SILAC permet donc un marquage isotopique des protéines obtenues dans chacune des conditions expérimentales, et il est alors possible de les mélanger avant identification par spectrométrie de masse MS/MS ce qui évite les variations dues au traitement indépendant des échantillons (Figure 29).

2.3 Marquage des partenaires d'ER α par la biotine et précipitation

Les clones sélectionnés ont été ensuite traités pendant 18 heures avec 500 μ M de biotine, puis les cellules ont été trypsinées et mélangées. Deux lots renfermant un même nombre de cellules ont été constitués : un lot de cellules exprimant ER α ou une NLS placée en position C-terminale de la miniTurbo (ER α -miniTurbo et NLS-miniTurbo), et l'autre avec les constructions en position N-terminale. Afin d'enrichir en protéines nucléaires, j'ai extrait les noyaux des deux lots de cellules puis effectué une extraction des protéines nucléaires dans un tampon RIPA non dénaturant. Les protéines biotinylées ont été ensuite isolées par incubation des extraits avec des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Après plusieurs lavages, dont un lavage très stringent (Urée 2 M, Tris pH8 10 mM), les protéines purifiées ont été identifiées par MS/MS sur la Plateforme Protéomique structurale et fonctionnelle/Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques Monod.

2.4 Résultats préliminaires

L'expérience de BioID a été effectuée deux fois pour chacun des deux lots de cellules : deux fois avec les constructions N-terminales, et deux fois avec les constructions C-terminales. Nous avons ainsi pu comparer les résultats obtenus dans l'ensemble de ces quatre expériences. Dans un premier temps, j'ai choisi de retenir les protéines au moins deux fois plus abondantes dans la condition ER α que dans la condition NLS. Selon ces critères, nous avons ainsi identifié environ 150 partenaires potentiels d'ER α pour chacune des expériences. Pour l'une des expériences effectuées avec la construction N-terminale, nous avons identifié environ 500 partenaires. Cet écart pourrait s'expliquer par une quantité d'extrait protéique plus importante, ce qui a pu augmenter le bruit de fond ou au contraire permettre l'identification de partenaires plus transitoires ou plus distaux qui sont plus rarement biotinylés.

En comparant les listes obtenues avec les quatre expériences, on retrouve de façon fiable 47 partenaires potentiels. Ces protéines présentent un enrichissement spécifique bien supérieur au

A

Partenaires protéiques d'ER α
identifiés avec les deux constructions
N-terminale et C-terminale :

Partenaires protéiques d'ER α
identifiés spécifiquement avec la
construction N-terminale :



Interactome d'ER α (BioGRID)

B

Partenaires d'ER α identifiés avec les deux types de constructions (miniTurbo en position N ou C-terminale d'ER α) :
ADNP2, **ARID1A**, ARID1B, ASXL2, BRD4, CIC, CUX1, DPF2, **EP300**, **ESR1**, **FOXL2**, GSE1, GTF2IRD1, **ISL1**, KDM1B, KMT2C, **KMT2D**, **LDB1**, **MED1**, **MED14**, MED15, MEF2D, **MTA1**, **NCOA6**, NFIB, NFIC, NIPBL, **NR5A1**, PAGR1A, PAXIP1, PIAS4, PROX1, **RBM14**, RORB, **SMARCA2**, **SMARCA4**, SMARCC1, **SMARCD1**, **SMARCD3**, **SMARCE1**, SSBP3, TCF20, TRERF1, TRIM33, ZBTB33, ZFP281, ZFP609

Partenaires d'ER α identifiés spécifiquement avec la miniTurbo en N-terminale d'ER α :
AURKB, CCAR1, CHD8, **CHD9**, DACH1, **DEK**, ERCC3, **EWSR1**, **HDAC1**, **HDAC2**, HIST1H1C, **HSPA8**, KDM6B, **MBD2**, **MTA2**, NEUROD4, NKTR, **NUDT21**, OGT, PHF21B, RBM33, **RSL1D1**, **SIN3A**, SLC25A12, SSBP4, ST18, **TAF2**, TBRG1, ZFP553

Figure 30. Résultats préliminaires d'identification des partenaires protéiques d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1. **A.** Représentation en diagramme de Venn de l'interactome d'ER α identifié avec la miniTurbo fusionnée à ER α en position N-terminale ou C-terminale (en gris) ou spécifiquement avec la miniTurbo en position N-terminale (en marron) vs l'interactome d'ER α d'après la base de données de BioGRID (en rouge). Nous avons identifié 47 partenaires protéiques d'ER α dans l'ensemble des expériences, dont 18 étaient déjà connus, ainsi que 29 partenaires protéiques d'ER α spécifiques de la construction N-terminale (miniTurbo-ER α) dont 12 sont déjà connus. **B.** Listes des partenaires protéiques d'ER α identifiés avec les deux constructions (en haut) ou spécifiquement avec la construction N-terminale (en bas). Les protéines en gras sont des partenaires protéiques d'ER α déjà identifiés dans la littérature (d'après la base de données de BioGRID).

seuil fixé de 2 fois (40 ± 30 fois, avec un minimum de 4 fois), suggérant que cette liste réunit les partenaires candidats les plus probables. Même si nous avons pu identifier plus de partenaires protéiques dans l'expérience n°4, la liste de partenaires retenus était la même que les résultats de cette expérience soit incluse ou non.

Pour rechercher un possible effet de la position de la biotine ligase, en position N ou C-terminale d'ER α , j'ai comparé les protéines identifiées dans ces deux conditions. J'ai observé que 29 protéines supplémentaires sont enrichies de façon significative dans les cellules exprimant une construction en position N-terminale ce qui suggère que la biotine ligase fusionnée en position C-terminale pourrait perturber l'interaction d'ER α avec certains de ses partenaires.

Dans la liste des partenaires identifiés avec les quatre expériences, nous retrouvons comme attendu ER α lui-même, auto-biotinylé par la biotine ligase à laquelle il est fusionné. La comparaison des protéines identifiées avec l'interactome connu d'ER α (base de données BioGRID, Oughtred R, *et al.* 2021), révèle que 18 protéines sont déjà connues comme étant des partenaires protéiques d'ER α . On retrouve par exemple FOXL2 (Kim S-Y, *et al.* 2009), P300 (Jaber B M, *et al.* 2004), MED1 (une protéine du complexe médiateur ; Nagpal N, *et al.* 2018) ou encore NR5A1 (Zhou D et Chen S, 2001) pour n'en citer que quelques-uns. Ces résultats valident notre approche expérimentale (Figure 30).

De façon intéressante, l'analyse en *clustering* fonctionnel en utilisant la base DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) montre que certaines ontologies (ou catégories fonctionnelles) sont significativement enrichies. Les protéines identifiées comme partenaires d'ER α sont en effet associées, par exemple, aux termes de transcription, régulation de la transcription, désassemblage des nucléosomes ou remodelage de la chromatine. Ceci est en accord avec le rôle important d'ER α dans les processus de régulation épigénétique de l'expression des gènes et renforce la validité des protéines identifiées en tant que partenaires potentiels d'ER α .

Afin d'avoir une vision globale de la structuration de cet interactome, j'ai utilisé le programme en ligne STRING (<https://string-db.org/>) qui permet de représenter les réseaux d'interactions physiques connues entre les protéines (Figure 31). Pour chaque partenaire, j'ai également comparé leur expression respective dans les lignées α T1-1, α T3-1 et L β T2 en utilisant les données de transcriptome en RNA-seq publiées par le laboratoire du Pr Mellon (Xie H, *et al.* 2017, GEO Accession : GSE104513).

De façon intéressante, les partenaires protéiques communs à l'ensemble des expériences de BioID se répartissent en plusieurs groupes fonctionnels distincts :

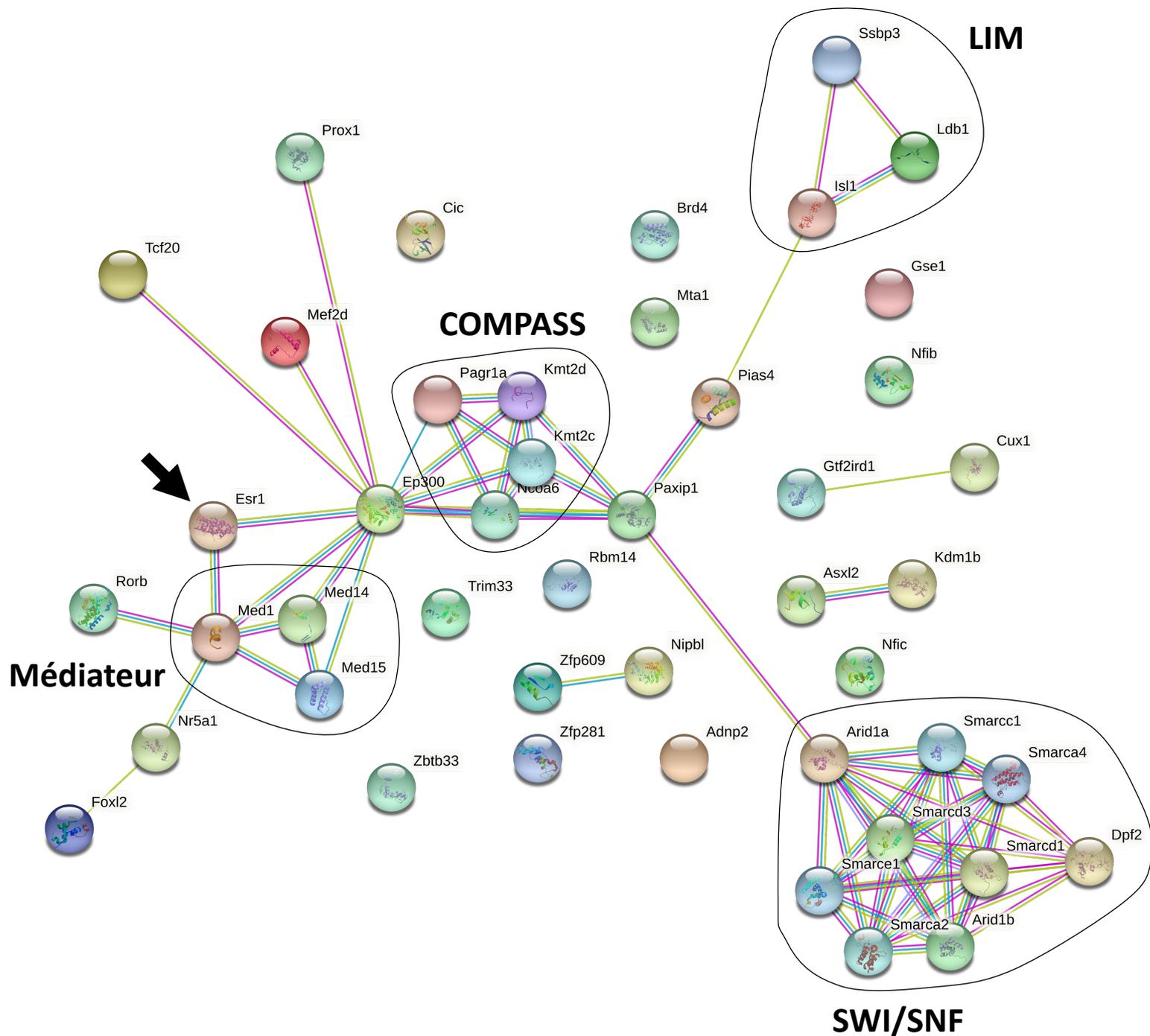


Figure 31. Réseau d'interactions physiques entre les différents partenaires d'ER α identifiés dans notre étude. Représentation des interactions protéiques, réalisée grâce au programme informatique STRING (<https://string-db.org/>) entre ER α (noté ESR1, indiqué par une flèche) et différentes protéines identifiées dans l'ensemble des expériences de cette étude comme étant des partenaires protéiques directs ou indirects d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1. Les liaisons entre les différentes protéines, matérialisées par des traits, indiquent des interactions protéiques identifiées. Les complexes protéiques identifiés dans cet *interactome* (Médiateur, SWI/SNF, COMPASS, LIM) sont entourés en noirs.

-Un premier groupe contient les protéines SMARC (A2, A4, C1, D1, D3 et E1) ainsi que les protéines ARID (1A et 1B). Ces protéines constituent l'essentiel du complexe SWI/SNF connu pour remodeler la chromatine et être associé à la régulation de l'expression génique. Il faut souligner que le transcrit *Smarca3* semble préférentiellement exprimé dans les cellules α T3-1. Cette protéine pourrait donc jouer un rôle clé dans l'activation du complexe SWI/SNF sur les *enhancers* cibles d'ER α dans les gonadotropes immatures.

- Certains des partenaires d'ER α font partie d'un second complexe, lui aussi impliqué dans le remodelage chromatinien : le complexe COMPASS constitué des protéines KMT (2C et 2D), NCOA6, PAXIP1 et PAGR1A. Aucun des gènes codants ces protéines ne semble être différenciellement exprimé selon le stade de différenciation du lignage gonadotrope. Il est donc possible qu'elles participent aux mécanismes fondamentaux de l'activation des *enhancers* cibles d'ER α .

- On retrouve aussi des membres du complexe Médiateur, avec en particulier MED1, MED14 et MED15, impliqué notamment dans la stabilisation du complexe *enhancer*/promoteur. L'interaction d'ER α avec MED1 a déjà été rapportée (Nagpal N, *et al.* 2018). De façon intéressante, si on étudie l'agencement dans l'espace des différentes sous-unités du complexe Médiateur, on remarque que MED1, MED14 et MED15 sont très proches au sein de ce complexe (Robinson P J, *et al.* 2015). Il est donc cohérent que ces trois sous-unités se retrouvent dans la sphère d'action de la biotine ligase fusionnée à ER α . Notre expérience suggère même qu'ER α interagirait avec la surface de la poche définie par ces trois sous-unités.

- ER α interagit aussi avec trois protéines de la famille LIM : ISL1, LDB1 et SSBP3. Ces trois protéines sont connues pour interagir ensemble et réguler l'expression de gènes critiques pour la fonction des cellules β pancréatiques (Galloway J R, *et al.* 2015). De façon intéressante, nous avons montré précédemment que le cistrome d'ER α est enrichi en sites de liaison pour ISL1. La découverte d'une interaction physique entre ISL1 et ER α renforce l'idée d'un rôle essentiel d'ISL1 dans l'action d'ER α dans les cellules gonadotropes. Une interaction entre ISL1 et ER α a d'ailleurs déjà été montrée dans les neurones hypothalamiques de rat (Gay F, *et al.* 2000).

- Enfin, nous avons identifié des interactants « isolés », soit car ils n'appartiennent pas à un complexe connu, soit parce qu'ils sont les seuls de leurs complexes identifiés par notre approche. Parmi eux, certains sont particulièrement intéressants, comme PROX1 (*Prospero-Related Homeobox 1*), un Homéobox important dans la différenciation du foie et des muscles, notamment (Burke Z et Oliver G, 2002 ; Kivelä R, *et al.* 2016). PROX1 est connu pour interagir avec des membres de la famille des récepteurs nucléaires (Lee S, *et al.* 2009 ; Takeda Y et Jetten A M, 2013), mais n'avait jamais encore été décrit comme interagissant avec ER α . D'après les

données de RNA-seq publiés par le Dr Mellon, *Prox1* serait exprimé préférentiellement dans les cellules α T3-1 ce qui en faisait en candidat prometteur. Néanmoins, mes propres résultats en RT-PCR en temps réel et en western-blot n'ont pas confirmé cette expression différentielle (données non montrées).

On note aussi l'identification de la protéine NFIB (*Nuclear Factor IB*). L'interaction entre NFIB et ER α a été décrite (Nassa G, *et al.* 2019) et est référencée dans les bases de données. Ce partenaire potentiel est intéressant à plusieurs titres : 1) il serait essentiellement et préférentiellement exprimé dans les cellules α T3-1 d'après les données de RNA-seq. 2) Il présente un motif protéique IXXLL très conservé chez les mammifères et proche du motif LXXLL qui permet l'interaction avec des membres de la famille des récepteurs nucléaires (Sun G, *et al.* 2007). 3) Sans avoir été qualifié de FP, NFIB est connu pour participer au maintien de l'accessibilité de la chromatine au niveau d'*enhancers* clés définissant l'identité des cellules souches des bulbes pileux (Adam R C, *et al.* 2020) faisant de lui un régulateur majeur du paysage épigénétique de ce lignage. Le cistrome d'ER α dans les cellules gonadotropes ne présente pas d'enrichissement pour le site de fixation canonique de NFIB (motif Jaspar MA1643.1 CTTGGCACNGTGCCAA), mais il n'est pas exclu que NFIB se fixe sur des motifs alternatifs par encore caractérisés. Si l'interaction physique entre ER α et NFIB dans les cellules α T3-1 est confirmée, il serait intéressant d'analyser les conséquences fonctionnelles de cette interaction, par exemple en invalidant NFIB dans ces cellules et en étudiant les conséquences de cette invalidation notamment sur l'accessibilité de la chromatine et la fixation d'ER α sur le génome.

Comme indiqué plus haut, 29 partenaires potentiels d'ER α ont été spécifiquement identifiés avec la construction N-terminale. Parmi ces protéines, on retrouve 12 partenaires d'ER α déjà identifiés dans la littérature (base de données de BioGRID, Oughtred R, *et al.* 2021) (Figure 30). De façon très intéressante, en étudiant ces partenaires, on retrouve un facteur de la famille bHLH, le facteur NEUROD4. Comme ce facteur n'a pas été observé dans l'autre construction, il sera nécessaire de vérifier cette interaction par co-immunoprécipitation. Il est également possible que l'interaction entre NEUROD4 et ER α soit indirecte. En effet, NEUROD4 ne possède pas de motif canonique d'interaction aux récepteurs nucléaires de type LXXLL. On peut donc imaginer que NEUROD4 interagirait avec ER α par le biais d'un intermédiaire et que cet éloignement topologique empêche une biotinylation efficace quand la biotine ligase est positionnée en position C-terminale d'ER α . Quoi qu'il en soit, si cette interaction était vérifiée, NEUROD4 serait un FP candidat très intéressant : il est préférentiellement exprimé dans les

cellules α T3-1, le cistrome d'ER α est enrichie en sites de liaison de facteurs de la sous famille des NEUROD/G et enfin, NEUROD4 présente une forte homologie de séquence avec NEUROD1, un FP des neurones (près de 90 % d'identité du domaine BHLH).

L'identification des partenaires physiques potentiels d'ER α dans les cellules gonadotropes immatures α T3-1 a donc permis d'ouvrir de nombreuses pistes prometteuses pour comprendre le rôle et le fonctionnement d'ER α dans cette lignée. Parmi celles-ci, ISL1 et NEUROD4 se positionnent comme de potentiels facteurs pionniers qui pourraient participer à la différenciation séquentielle du lignage gonadotrope. Ces hypothèses méritent d'être étudiées en priorité. Un autre candidat, le facteur NFIB, offre une piste sérieuse pour comprendre les mécanismes permettant la fixation d'ER α sur la chromatine au cours de la différenciation du lignage. Actuellement, aucune interaction physique ou fonctionnelle entre NFIB et ISL1 n'a été démontrée à notre connaissance. Il serait donc très intéressant d'étudier l'existence de telles interactions et leur rôle potentiel dans la spécification du lignage gonadotrope.

Table 1. Amorces utilisées pour les clonages dans le vecteur luciférase.

Enhancer a core F	ATGATGAAGCTTAGCTGAGGTCTGGGTAGAGT
Enhancer a core R	ATGATGGGTGACCAGGTCACATCGACCTGGGT
Enhancer a F3 F	ATGATGAAGCTTAGGTCGATGTGACCTCTCTG
Enhancer a F4 F	ATGATGAAGCTTTCTGGGTAGAGTCTGCTG
Enhancer a F5 F	ATGATGAAGCTTGAGTCTGCTGCAGGGCTG
Enhancer a F6 F	ATGATGAAGCTTTGCAGGGCTGGGCACCCA
Enhancer a F7 F	ATGATGAAGCTTTGGGCACCCAGGTCGATG
Enhancer a Δ 1 F	CAGCCCCACAGCTGAGTCTGCTGCAGGGCTG
Enhancer a Δ 1 R	CAGCCCTGCAGCAGACTCAGCTGTGGGGCTG
Enhancer a Δ 2 F	GTCTGGGTAGAGGTCTGGGTAGAGA
Enhancer a Δ 2 R	TCTCTACCCAGACCTCTACCCAGAC
Enhancer a Δ 3 F	GTAGAGTCTGCTGACCCAGGTCGATG
Enhancer a Δ 3 R	CATCGACCTGGGTGAGCAGACTCTAC
Enhancer a Δ 3G F	GTAGAGTCTGCTGCACTGGGCACCCAGGTCGA
Enhancer a Δ 3G R	TCGACCTGGGTGCCAGTGCAGCAGACTCTAC
Enhancer a Δ 3G-2 F	GAGTCTGCTGCAGGGGGCACCCAGGTCGAT
Enhancer a Δ 3G-2 R	ATCGACCTGGGTGCCCCCTGCAGCAGACTC
Enhancer a Δ 3G-3 F	TCTGCTGCAGGGCTGACCCAGGTCGATGTG
Enhancer a Δ 3G-3 R	CACATCGACCTGGGTGAGCCCTGCAGCAGA
Enhancer a Δ 3-1 F	GTAGAGTCTGCTGCAGGCACCCAGGTCGAT
Enhancer a Δ 3-1 R	ATCGACCTGGGTGCCTGCAGCAGACTCTAC
Enhancer a Δ 3-2 F	GAGTCTGCTGCAGGGACCCAGGTCGATGTG
Enhancer a Δ 3-2 R	CACATCGACCTGGGTCCCTGCAGCAGACTC
Enhancer a 4mut F	GTAGAGTCTGCTGGACGGGTGCGCACCCAGGTCGA
Enhancer a 4mut R	TCGACCTGGGTGCGCACCCGTCAGCAGACTCTAC
Enhancer a 2mut F	GTAGAGTCTGCTGGAGGGCTGCGCACCCAGGTCGA
Enhancer a 2mut R	TCGACCTGGGTGCGCAGCCCTCCAGCAGACTCTAC
Enhancer a 1mut F	GTAGAGTCTGCTGCAGGGGTGGGCACCCAGGTCGA
Enhancer a 1mut R	TCGACCTGGGTGCCACCCCTGCAGCAGACTCTAC

Matériel et méthodes

Culture cellulaire :

Les lignées de cellules gonadotropes murines immortalisées α T3-1 et L β T2 (généreusement données par le P. Mellon, Université de Californie, La Jolla, CA) sont cultivées en culture monocouche dans du milieu DMEM « high-glucose » supplémenté par 10% de sérum fœtal de veau et 0.2% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) et maintenues à 37°C avec 5% de CO₂.

Système rapporteur luciférase :

La séquence génomique de l'*enhancer* α a été amplifiée à partir d'ADN de souris et clonée dans le vecteur luciférase pgl3 (Promega) en amont du promoteur minimal de la prolactine (Prl) comme précédemment décrit (Pincas H, *et al.* 2001). Les troncations, délétions et mutations de la séquence de l'*enhancer* α ont été effectuées par PCR ou PCR fusion. Les amorces utilisées sont décrites dans la Table 1.

Brièvement, 50 000 cellules sont transitoirement transfectées par Lipofectamine 2000® (ThermoFisher Scientific) en plaque 96 puits avec, dans chaque puit, 100 ng de vecteur pgl3-Prl contenant ou non une séquence de l'*enhancer* α , et 5 ng de vecteur pRL-SV Renilla qui sert de contrôle interne pour la normalisation. Lorsque cela est indiqué, les vecteurs luciférase ont été co-transfectés avec 100 ng d'un vecteur d'expression. Quarante-huit heures après la transfection, les activités luciférase et rénilla sont mesurées en utilisant le kit Dual-Luciférase Reporter Assay (Promega) selon les instructions du fournisseur. Chaque expérience a été faite en quadruplicat et répétée trois fois de manière indépendante. L'activité luciférase a été normalisée par rapport à l'activité rénilla, puis rapporté au niveau d'activité du vecteur pgl3-Prl ne contenant aucune séquence de l'*enhancer* α . Les résultats ont été comparés par un test ANOVA suivi d'une comparaison multiple de Dunnett.

Immunoprécipitation de la chromatine d'ER α et séquençage massif :

L'immunoprécipitation de la chromatine d'ER α a été effectuée avec le kit « truChIP Chromatin Shearing » (Covaris) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, cinquante millions de cellules α T3-1 ont été fixées au formaldéhyde (*cross-link*) pendant 10 minutes à température ambiante, puis la fixation a été stoppée par ajout de glycine. Les noyaux cellulaires ont été isolés et lysés, puis la chromatine a été fragmentée par traitement aux ultrasons (système « Covaris Focused Ultrasonicator M220 », *peak power* : 75, durée : 10 minutes, à 4°C). La chromatine (600 μ g) a été mise en contact avec 15 μ g d'anticorps anti-ER α (abcam

« ab32063 ») pendant 16 heures sur roue tournante à 4°C, puis le mélange a été incubé pendant 2 heures avec des billes magnétiques Dynabeads™ Protein G (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Après quatre lavages de stringence croissante et élution des immunoprécipitats obtenus, comme décrit précédemment (Laverrière J-N, *et al.* 2016), la chromatine a été chauffée pour casser les liaisons, puis les protéines ont été digérées par ajout de protéases. L'ADN a été purifié par extraction phénol/chloroforme puis précipité. Trois expériences indépendantes ont été effectuées.

Chacun des immunoprécipitats (50 µg/immunoprécipitats) a été séquencé par le système NextSeq 500 de la plateforme iGenSeq de l'Institut du Cerveau et de la Moelle (ICM), Paris. Les séquences amplifiées ont été alignées sur le génome de souris mm9 par le logiciel BOWTIE 2 (Langmead B et Salzberg S L, 2012) et les séquences de fixation d'ERα ont été identifiées par le logiciel MACS2 (Zhang Y, *et al.* 2008). Toutes les analyses (identification des gènes à proximité des sites de fixation d'ERα grâce à l'outil *annoted*, et recherche de motifs de sites de fixation dans les 100 bp autour de l'ERE grâce à l'outil *find motif*) ont été effectuées avec la suite de programme HOMER (Heinz S, *et al.* 2010). Les données sont visualisées avec le logiciel IVG (Thorvaldsdóttir H, *et al.* 2013).

Identification par biotinylation proximale (BioID) des partenaires protéiques d'ERα :

- Génération de lignées cellulaires αT3-1 sur-exprimant ERα fusionnée à la biotine ligase miniTurbo :

Afin d'identifier les protéines partenaires et avoisinantes d'ERα, nous avons utilisé la technique d'identification par biotinylation proximale (ou BioID ; Li P, *et al.* 2019). Pour cela, nous avons généré des cellules gonadotropes immatures αT3-1 sur-exprimant ERα fusionné avec la séquence codante de l'enzyme *biotine ligase* de type Miniturbo (Branon T C, *et al.* 2018) placée en position N-terminale ou C-terminale d'ERα (respectivement, Miniturbo-ERα et ERα-Miniturbo). Le vecteur d'expression contient également une cassette de résistance à l'hygromycine pour la sélection des clones transfectés.

Brièvement, cinq millions de cellules ont été électroporées avec 10 µg du vecteur d'expression d'ERα avec le système Neon® Transfection System (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur (deux pulses à 1500 mV pendant 15 ms). Les cellules sur-exprimant la miniTurbo fusionnée avec une séquence de localisation nucléaire en N-terminale (NLS-Miniturbo) ou C-terminale (Miniturbo-NLS) sont utilisées comme contrôle. Les cellules ont étéensemencées à faible densité et maintenues dans du milieu de culture classique (décrit

dans la partie §Culture cellulaire) supplémenté de 100 μM d'hygromycine. La présence du transgène a été vérifiée dans les colonies isolées par western blot (résultats non montrés). Pour chaque condition, au moins deux clones indépendants ont été sélectionnés.

- **Biotinylation des protéines dans les lignées $\alpha\text{T3-1}$ miniTurbo :**

Le marquage par biotinylation des protéines dans les différents clones de cellules $\alpha\text{T3-1}$ générées pour l'analyse d'identification protéique par biotinylation proximale ont été traitées avec 500 μM de D-biotine pendant 18 heures. Une vérification du marquage des protéines a été effectuée par western blot. Brièvement, les protéines cellulaires (après traitement à la D-biotine) ont été extraites par lyse au tampon Laemmli et séparées sur un gel SDS-PAGE de 10%. Après transfert des protéines, les membranes de nitrocellulose ont été pré-saturées dans du TBS-0.01%Tween20 supplémenté de 5% de lait pendant 1 heure sous agitation à température ambiante (RT) puis incubés avec de la streptavidine couplé à la HRP (*Horse Radishperoxidase*) dans du TBS-0.01%Tween20 supplémenté de 5% de lait pendant 1 heure sous agitation à RT. La détection des protéines biotinylées a été effectuée avec les réactifs Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) et visualisée par chimioluminescence avec le système Amersham Imager 680.

- **Identification et quantification des peptides en condition SILAC (Stable Isotope Labeling with amino acids in cell culture) :**

Afin d'identifier et de quantifier les protéines marquées par stratégie BioID, les lignées cellulaires $\alpha\text{T3-1}$ générées ont été maintenues en culture en milieu SILAC (Ong S-E et Mann M, 2006). Pour cela, les cellules ont été maintenues en culture monocouche dans du milieu DMEM SILAC (ThermoFisher Scientific), supplémenté de 10% de sérum de veau foetal dialysé (ThermoFisher Scientific), de L-Proline à 200 $\mu\text{g/ml}$ (ThermoFisher Scientific), 0.2% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) et 100 μM d'hygromycine. Le milieu a été supplémenté en isotopes dits « moyens » $^{13}\text{C}_6\text{-L-Arginine-HCl}$ et 4,4,5,5- $\text{D}_4\text{-L-Lysine-2HCl}$ (respectivement 86,5 et 148,7 mg/ml) pour les cellules $\alpha\text{T3-1}$ Miniturbo-NLS ou NLS-Miniturbo ou des isotopes dits « lourds » $^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_4\text{-L-Arginine-HCl}$ et $^{13}\text{C}_6\text{-}^{15}\text{N}_2\text{-L-Lysine-2HCl}$ (respectivement 88 et 151,3 mg/ml) pour les cellules $\alpha\text{T3-1}$ Miniturbo-ER α ou ER α -Miniturbo. Les cellules ont été traitées à la D-biotine (comme décrit dans la partie §Biotinylation des protéines dans les lignées $\alpha\text{T3-1}$ miniTurbo), puis un même nombre de cellules a été mélangé. Les noyaux cellulaires ont été extraits puis lysés dans du tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH7.8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA,

inhibiteurs de protéases). Les extraits protéiques ont été incubés pendant 16 heures sur roue tournante avec 30 µg de billes magnétiques Streptavidine Dynabeads™ M-280 DYNAL™ (ThermoFisher Scientific). Après quatre lavages dans du tampon RIPA et un lavage dans un tampon de forte stringence (2M Urée, 10 mM Tris pH8), les billes ont été resuspendues dans du tampon NH_4HCO_3 25 mM. Les protéines ont été purifiées par extraction à l'acétone, puis digérées par trypsine. Les peptides protéiques ont été identifiés par spectrométrie de masse à la plateforme de Protéomique/Spectrométrie de Masse de l'Institut Jacques Monod (IJM), Paris. Les expériences ont été réalisées deux fois pour chacune des constructions plasmidiques. Les peptides identifiés comme étant au moins deux fois plus présents dans la condition isotope « lourds » que la condition isotopes « moyens » sont considérés comme étant spécifiquement liés à la présence d'ER α . L'efficacité d'incorporation des isotopes a été testée en spectrométrie de masse et atteint plus de 98%.

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de recherche montrent que l'expression de *Nr5a1*, un gène incontournable de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire, est régulée par un jeu d'enhancers et que l'initiation de sa transcription est sous le contrôle d'un enhancer intronique transitoire jusqu'alors non décrit, l'enhancer α . Cet enhancer, qui présente une très forte conservation de séquence chez les mammifères, est activé par le récepteur nucléaire ER α , sous la dépendance de son ligand, l'E2. La fixation d'ER α sur l'enhancer entraîne un remodelage de la chromatine nécessaire à l'expression du gène. Les connaissances actuelles sur le mécanisme d'action épigénétique d'ER α suggérant fortement qu'il doit exister d'autres événements moléculaires, à la fois en amont et en aval du recrutement d'ER α sur l'enhancer, nécessaires à cette activation, j'ai initié la caractérisation des partenaires et cibles d'action d'ER α dans la cellule gonadotrope immature. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse soulèvent des questionnements et proposent de nouvelles pistes de recherche.

1. La régulation de l'expression de *Nr5a1* au cours de la différenciation gonadotrope serait dépendante d'un jeu d'enhancers

Mes travaux suggèrent que l'expression de *Nr5a1* au cours de la différenciation des cellules gonadotropes est régulée non pas par une séquence *cis*-régulatrice unique mais par un jeu d'enhancers mobilisés séquentiellement : d'abord par l'enhancer α , de façon transitoire, puis par l'enhancer β précédemment décrit (Shima Y, *et al.* 2008). Renforçant la notion d'un jeu d'enhancers, nous avons montré que l'enhancer nécessaire à l'expression de *Nr5a1* dans les cellules de Leydig fœtales (enhancer FLE ; Shima Y, *et al.* 2012) semble également actif dans les cellules gonadotropes immatures. Toutefois, cet enhancer n'est pas strictement nécessaire au maintien de l'expression de *Nr5a1* dans notre modèle de cellules gonadotropes immatures (Pacini V, *et al.* 2019).

Un tel mécanisme impliquant un jeu d'enhancers, mobilisés séquentiellement, a été montré comme important dans le maintien de l'expression de gènes clés au cours de la différenciation terminale des motoneurones chez la souris (Rhee H S, *et al.* 2016). Dans ce système, des enhancers transitoires sont recrutés par une combinaison de facteurs faisant intervenir ISL1 et LHX3, puis ces enhancers sont rapidement inactivés au profit d'un second jeu d'enhancers liant cette fois ISL1 et HNF6. Il faut souligner qu'ISL1 est exprimé très tôt dans les cellules gonadotropes et que nous avons montré qu'il interagit physiquement avec ER α . Il serait donc

intéressant d'étudier si ISL1 participe au recrutement d'ER α sur les *enhancers* des cellules gonadotropes immatures et notamment sur l'*enhancer* α de *Nr5a1*, mais aussi d'étudier son rôle potentiel dans la régulation de l'*enhancer* β (indépendamment d'ER α cette fois) pour déterminer si ISL1 joue un rôle dans le relais d'activité entre ces deux *enhancers*.

Plusieurs modalités peuvent être envisagées pour expliquer l'activation séquentielle d'*enhancers* au cours de la différenciation gonadotrope :

- Les *enhancers* α et β fonctionneraient indépendamment l'un de l'autre et seraient mobilisés séquentiellement sous l'effet de combinaisons différentes de FT.

- L'activation de ces *enhancers* serait interdépendante, faisant intervenir un élément régulateur commun. Cet élément pourrait être un jeu de FT partagés par les deux combinaisons activant les *enhancers* α et β . Ces facteurs, de la même façon qu'ISL1 dans les motoneurones, assureraient une continuité dans la régulation de l'expression de *Nr5a1*. Néanmoins, si l'on sait aujourd'hui que l'*enhancer* β est régulé par les facteurs PITX2 et probablement EGR1, on ignore encore si ces FT régulent aussi l'activité de l'*enhancer* α . Une meilleure caractérisation des combinaisons de FT impliquées dans l'activation des deux *enhancers* permettra de déterminer s'il existe une interdépendance fonctionnelle entre eux. L'élément régulateur commun pourrait aussi être les *enhancers* eux-mêmes et on peut imaginer que l'*enhancer* FLE permettrait l'activation successive des *enhancers* α et β . Nos travaux suggèrent en effet fortement que l'*enhancer* FLE est mobilisé secondairement à l'*enhancer* α et qu'il reste actif non seulement dans les cellules gonadotropes immatures mais aussi matures. De plus et de façon intéressante, nous avons montré par capture de la conformation chromatinienne que l'*enhancer* α interagit physiquement avec l'*enhancer* FLE dans les cellules gonadotropes immatures. On pourrait donc imaginer que l'*enhancer* α activé participe à l'activation de l'*enhancer* FLE en facilitant le recrutement, à son niveau, de complexes activateurs comme, par exemple, le complexe Médiateur. Une fois l'*enhancer* α inactivé, l'*enhancer* FLE pourrait à son tour se rapprocher de l'*enhancer* β pour favoriser son activation. Cette séquence d'évènements est néanmoins purement spéculative car les mécanismes moléculaires sous-tendant les interactions fonctionnelles entre les *enhancers* d'un même locus demeurent encore très mal connus.

Afin d'étudier la dynamique de ces mécanismes, il conviendrait de développer un modèle d'étude qui permette de suivre en continu la différenciation gonadotrope hypophysaire. Les lignées modèles α T1-1, α T3-1 et L β T2, même si elles constituent un outil précieux, sont des photographies de trois états figés du processus. Elles ne permettent donc pas d'appréhender les

étapes transitoires entre ces états. Des travaux récents ont montré qu'il est possible d'induire la différenciation d'« hypophysés » *in vitro*, et donc des cellules gonadotropes, à partir de cellules souches embryonnaires chez la souris et l'espèce humaine (Suga H, *et al.* 2011 ; Ozone C, *et al.* 2016). Ce modèle dynamique devrait permettre d'étudier l'interdépendance fonctionnelle entre les *enhancers* de *Nr5a1*. Par exemple, il serait possible de déléter l'*enhancer* α et d'étudier les perturbations induites de la mobilisation des *enhancers* FLE et β , et de l'expression de *Nr5a1*.

2. Quels sont les mécanismes de l'activation de l'*enhancer* α ?

2.1 Identification des partenaires nécessaires à l'activité d'ER α

Plusieurs questions restent ouvertes sur les mécanismes nécessaires à l'activation de l'*enhancer* α dans les cellules gonadotropes immatures. En effet, malgré le rôle central joué par ER α , celui-ci nécessite un FP pour être recruté à l'*enhancer* et n'agit qu'en recrutant, à son tour, de nombreux acteurs de la machinerie de remodelage et d'activation de la chromatine. Les données bibliographiques proposent un processus complexe et séquentiel au cours duquel se succèdent des étapes d'étiquetage des *enhancers* par des FP, suivies d'une pré-activation des *enhancers* par le recrutement d'ER α et de certains modificateurs chromatiniens et enfin, le recrutement de co-activateurs supplémentaires qui permettent d'augmenter de façon significative le recrutement des complexes de remodelage et d'activation de la chromatine, conduisant alors à la transcription du gène. Dans notre modèle de différenciation, nous avons une photographie de l'étape de pré-activation, avec les cellules progénitrices α T1-1 dans lesquelles l'*enhancer* α est inactif mais porte à la fois des marques d'activation et de répression, et une photographie de l'étape achevée d'activation avec les cellules immatures α T3-1, dans lesquelles l'*enhancer* α présente uniquement des marques d'activation. Il est donc très probable que le FP nécessaire à la pré-activation soit exprimé et recruté à l'*enhancer* α à la fois dans les cellules progénitrices et immatures mais que les co-activateurs, nécessaires à l'activation complète, ne soient recrutés que dans les cellules immatures.

Sur la base de ce postulat, j'ai entrepris d'identifier, dans les cellules α T3-1, l'ensemble des régions génomiques cibles d'ER α par CHIP-seq ainsi que l'ensemble des partenaires protéiques d'ER α par BioID. Ceci m'a permis de faire émerger de nombreux FP et co-activateurs candidats. Deux candidats FP sont particulièrement intéressants : ISL1 et NEUROD4. En effet, ils interagissent tous deux avec ER α et leurs motifs de liaison sont enrichis dans le cistrome

d'ER α . En outre, ISL1 a été déjà décrit comme FP potentiel dans les cardiomyocytes (Gao R, *et al.* 2019) ; c'est, de plus, un facteur important pour la différenciation neuronale (Pfaff S L, *et al.* 1996) et, enfin, il est connu pour réguler l'expression du récepteur de la GnRH dans les cellules gonadotropes (Schang A L, *et al.* 2013). NEUROD4 n'a pas été décrit encore comme un FP, cependant il est capable de reprogrammer les cellules en neurones (Masserdotti G, *et al.* 2015) et il partage une homologie de séquence importante avec NEUROD1, considéré comme un FP (Matsuda T, *et al.* 2019). L'analyse du cistrome d'ER α suggère qu'ISL1 et NEUROD4 agiraient comme FP à des moments différents de la différenciation précoce du lignage gonadotrope : ISL1 pourrait agir très tôt, dès la transition entre cellules progénitrices et immatures, alors que NEUROD4 serait mobilisé plus tardivement dans les cellules immatures. La caractérisation de l'interactome protéique d'ER α nous a aussi permis de proposer des partenaires d'ER α susceptibles de participer à la dernière étape d'activation de l'*enhancer* α . Certains de ses partenaires, comme SMARCD3 ou MED1, font partie de complexes comme Médiateur, COMPASS ou SWI/SNF, déjà connus pour être impliqués dans l'activation d'*enhancers*, notamment au travers de leur recrutement par ER α . Ces deux facteurs sont des candidats dont l'étude est prioritaire. Le rôle des différents candidats, FP comme co-activateurs, dans l'expression de *Nr5a1* est analysé actuellement au laboratoire. Pour cela, nous avons développé une approche dans les cellules α T3-1 combinant leur extinction transitoire par stratégie CRISPR-Cas9 et la mesure du niveau d'expression de NR5A1 avec un système rapporteur luciférase permettant un criblage rapide. Brièvement, les cellules α T3-1 sont co-transfectées d'une part, avec un vecteur rapporteur luciférase dont l'expression est sous le contrôle d'éléments de réponse de NR5A1, reflétant donc la quantité de NR5A1 dans la cellule, et d'autre part, par un vecteur d'expression de la CAS9 combiné à un vecteur d'expression d'un ARN guide afin d'invalider l'expression du gène candidat. Si le gène candidat code une protéine contrôlant l'expression de *Nr5a1*, alors son invalidation conduira à une diminution de l'expression de NR5A1 mesurée par l'activité luciférase. Les candidats ayant rempli ces conditions seront ensuite testés de façon plus précise. Pour cela, nous mesurerons tout d'abord par ChIP, leur fixation à la chromatine au niveau de l'*enhancer* α , puis les effets épigénétiques de leur recrutement sur l'*enhancer* seront évalués. Nous étudierons notamment les changements concernant l'accessibilité de la chromatine, le recrutement d'ER α , les marques d'histone et la méthylation de l'ADN. Des études seront conduites en parallèle sur des cellules α T1-1 dans lesquelles nous sur-exprimerons les gènes candidats en espérant ainsi faire progresser les cellules progénitrices dans le processus de différenciation et possiblement induire l'expression de *Nr5a1*.

Si les acteurs moléculaires que nous avons identifiés, et en particulier les deux FP potentiels, sont des acteurs clefs de la progression de la différenciation du lignage gonadotrope, cela suggérerait que celle-ci comporterait beaucoup plus d'étapes qu'initialement envisagé. Il conviendrait donc d'envisager des étapes intermédiaires de maturation moléculaire entre les états progéniteurs, immatures et matures. ER α constituerait un véritable fil rouge de la maturation entre les phases progéniteurs et immatures et serait mobilisé différenciellement par un jeu dynamique de facteurs pionniers, exprimés ou activés séquentiellement.

2.2 Mécanismes d'activation de l'*enhancer* α *in vivo* ?

Nous avons montré, *in vitro*, que l'activation de l'*enhancer* α par ER α est dépendante de son ligand. *In vivo*, l'origine des œstrogènes susceptibles d'activer l'*enhancer* α à des stades précoces du développement de l'hypophyse est encore hypothétique. Même si les niveaux circulants d'œstrogènes produits par l'organisme maternel sont beaucoup plus réduits chez les rongeurs que dans l'espèce humaine, des œstrogènes maternels sont présents pendant toute la gestation et donc autour de 12-14 jpc (Barkley M S, *et al.* 1979). A cette période, des androgènes sont aussi produits par le fœtus mâle et pourraient être, tout comme les androgènes d'origine maternelle, aromatisés en œstrogènes par le fœtus (Pointis G, *et al.* 1979). Comme la folliculogénèse ne débute qu'après la naissance chez les rongeurs, le fœtus femelle ne produit pas lui-même des œstrogènes. Quelle que soit leur origine, les œstrogènes circulants sont très probablement inactivés par deux mécanismes différents. Dès 9,5 jpc, le foie de l'embryon et le sac vitellin produisent une protéine sérique de type albumine, l' α -foetoprotéine (Kwon G S, *et al.* 2006) qui lie sélectivement les œstrogènes circulants et empêchent leurs effets, notamment au niveau cérébral (Bakker J, *et al.* 2006 ; De Mees C, *et al.* 2006). De plus, le placenta est capable de sulfoner les œstrogènes maternels, les rendant ainsi inactifs. Même si l'action de type endocrine des œstrogènes est peu probable, il est possible que des œstrogènes actifs soient produits localement dans l'hypophyse en développement, notamment par désulfonation. Plusieurs arguments sont en faveur d'une telle hypothèse : 1) l'activité de désulfonation des œstrogènes a déjà été décrite dans le cerveau des rongeurs en période périnatale et adulte (Mortaud S, *et al.* 1996) et pourrait fournir, comme l'aromatase, une source d'œstrogènes importante pour la sexualisation du cerveau ; 2) l'hypophyse présente une activité de désulfonation, qui est même supérieure à celle du cerveau, au moins dans la période post-natale (Hobkirk R, *et al.* 1987) ; 3) enfin nous avons montré que les cellules α T3-1 expriment une des

enzymes impliquées dans la désulfonation, la *Steroid Sulfatase* (STS). Prouver sans ambiguïté l'existence d'œstrogènes actifs dans l'hypophyse embryonnaire reste néanmoins techniquement difficile car la petite taille des structures et la difficulté d'isoler précisément la poche de Rathke compromettent le dosage des stéroïdes présents dans l'hypophyse à un stade aussi précoce que 13,5 jpc.

L'implication cruciale d'ER α dans la régulation de *Nr5a1* démontrée *in vitro* conduit naturellement à penser que l'inactivation d'ER α *in vivo* entraînerait des défauts de la différenciation du lignage. Pourtant, si l'inactivation hypophysaire d'ER α chez la souris entraîne des anomalies de la fonction gonadotrope, les cellules gonadotropes, quant à elles, semblent être différenciées (Gieske M C, *et al.* 2008). Il n'y a pas eu, cependant, d'études précises de la différenciation gonadotrope hypophysaire chez ce mutant ce qui fait que des anomalies plus subtiles de la différenciation comme des retards ou des défauts quantitatifs ont pu ne pas avoir été décelés. Il est aussi possible que d'autres récepteurs nucléaires comme ER β , se fixant sur le motif ERE, compensent fonctionnellement l'absence d'ER α *in vivo*. Il a été, en effet, suggéré que dans les hypophyses adultes invalidées pour ER α , la stimulation d'ER β par l'administration de fortes doses d'un agoniste spécifique de ces récepteurs entraîne une réactivation partielle des cellules gonadotropes mesurée selon des critères de morphologies ultrastructurales (Sánchez-Criado J E, *et al.* 2012). Pour s'assurer de la nécessité de la signalisation œstrogénique dans la différenciation gonadotrope, il serait intéressant de disposer d'un modèle murin exprimant une luciférase sous le contrôle d'un promoteur artificiel sensible aux récepteurs nucléaires de l'E2, comme celui décrit dans Maggi A et Villa A, 2014. Ce modèle permettrait de déterminer sans ambiguïté si ER α (ou ER β) est actif dans l'hypophyse en développement. En utilisant le même modèle, couplé à une approche stéréotaxique d'injection d'antagoniste de l'E2, à proximité immédiate de l'hypophyse embryonnaire, il serait possible d'inhiber localement ER α , en vérifiant l'efficacité de cette inhibition par le système luciférase, et d'en étudier les conséquences sur la mobilisation de l'enhancer α (en ATAC-qPCR) et sur l'expression de *Nr5a1*.

3. Mécanismes moléculaires de l'inactivation de l'enhancer α

L'enhancer α n'est activé que transitoirement au cours de la différenciation du lignage et très peu de données sont actuellement accessibles concernant son inactivation. Notre modèle d'étude suggère que l'expression d'ER α diminue au moins transitoirement entre 13,5 jpc et 16-

17 jpc, les stades représentés respectivement par les cellules α T3-1 et L β T2. Nous avons montré qu'interférer avec la fixation d'ER α sur l'*enhancer* α entraîne une inhibition chromatinienne de l'*enhancer* avec éviction de la marque H3K27ac, augmentation de l'encombrement chromatinien et enfin reméthylation des CpG. On peut imaginer deux types de mécanismes, non exclusif, à l'origine de ces changements : 1) des mécanismes passifs : la simple absence d'ER α entraînant une diminution du recrutement des acteurs chromatinien activateurs comme la P300, les chaperonnes d'histones, ou les TET déméthylases, ou 2) des mécanismes actifs : la présence d'ER α pouvant en effet freiner directement ou indirectement le recrutement d'acteurs inhibiteurs comme les méthyltransférases, les histones desacétylases, etc... Afin de mieux caractériser ces mécanismes, il serait possible de déployer une approche visant à caractériser l'ensemble de protéines fixées à une séquence donnée. Ce type de technologie, visant à purifier la séquence endogène d'une région génomique donnée puis à caractériser tous les partenaires protéiques par spectrométrie de masse, commence à être développée depuis quelques années. Il serait possible par exemple de cibler sur l'*enhancer* α une CAS9 inactivée (dCAS9) fusionnée à une biotine ligase afin de marquer par la biotine toutes les protéines fixées sur l'*enhancer* dans la lignée α T3-1, dans la lignée α T3-1 avec délétion de l'ERE de l'*enhancer* α , mais également dans les lignées α T1-1 et L β T2. Cette expérience, qui nécessiterait néanmoins probablement beaucoup de mises au point techniques, pourrait permettre d'identifier les acteurs impliqués dans l'inactivation mais aussi dans l'activation de l'*enhancer*.

4. Mobilisation de l'*enhancer* α à nouveau à l'âge adulte

Si l'*enhancer* α est important pour la différenciation du lignage gonadotrope., ceci n'exclut pas qu'il puisse être à nouveau mobilisé à l'âge adulte et participer à la régulation de *Nr5a1* à cette période de la vie reproductive. Cette hypothèse est confortée par un résultat récent de l'équipe du Dr Drouin (Mayran A, *et al.* 2019). Dans ce travail, l'accessibilité de la chromatine de cellules gonadotropes triées à partir d'hypophyses de souris mâles adultes a été évaluée par ATAC-seq et le locus de *Nr5a1* est montré en exemple. On peut noter que l'*enhancer* β , dans l'intron 6, présente une accessibilité de la chromatine importante compatible avec le maintien de son activité à l'âge adulte. De façon plus surprenante, on peut aussi observer que l'*enhancer* α dans l'intron 4 présente également une chromatine accessible, suggérant qu'il serait aussi mobilisé à l'âge adulte. Il n'est cependant pas possible de savoir, à partir de ces données, si ce sont les mêmes cellules gonadotropes qui présentent une accessibilité des deux *enhancers* ou s'il existe deux populations de gonadotropes avec des mobilisations spécifiques d'*enhancers*.

De façon intéressante, une récente étude de transcriptomique à haut-débit en cellules uniques faites sur des hypophyses embryonnaires humaines a mis en évidence l'existence de deux populations de cellules gonadotropes au cours de leur différenciation (Zhang S, *et al.* 2020). Ceci n'a pas été rapporté dans des études utilisant une approche similaire sur des hypophyses de souris et de rat adultes (Cheung L Y M, *et al.* 2018 ; Fletcher P A, *et al.* 2019) mais de telles populations n'y ont pas été spécifiquement recherchées. De plus, il est possible que ces populations correspondent à des états fonctionnels différents qui apparaissent de façon dynamique en fonction du contexte physiologique de stimulation des cellules gonadotropes, par la GnRH par exemple. De façon intéressante, l'expression de *Nr5a1* est sensible à l'environnement hormonal stéroïdien alors qu'aucuns sites de fixation pour des récepteurs nucléaires n'a pu être identifié sur les promoteurs (Majdic G, *et al.* 1997). On pourrait alors imaginer que l'*enhancer α* est mobilisé, par exemple pendant le proestrus du cycle œstrien, sous la stimulation des fortes concentrations circulantes en E2 permettrait d'augmenter significativement l'expression de NR5A1 et permettre ainsi de stimuler fortement l'expression de *Lhb*, une de ses cibles directes. Afin de mettre en évidence ces différentes populations fonctionnelles de cellules gonadotropes et la possibilité d'un recrutement différentiel de l'*enhancer α* selon le contexte physiologique, nous avons entrepris au laboratoire une étude en ATAC-seq en cellules uniques au cours du cycle œstrien chez le rat. La régulation de l'expression de *Nr5a1* pendant la vie reproductive pourrait donc s'avérer aussi plastique que celle mise en œuvre pendant l'embryogenèse et il serait fascinant de comparer les mécanismes opérant à ces deux périodes distinctes de la vie reproductive. Il n'existe malheureusement pas de modèle de cellules gonadotropes adultes qui permettrait ces études *in vitro* mais le développement rapide des techniques d'épigénomique en cellules uniques, de plus en plus accessibles aujourd'hui, offre une opportunité unique pour comprendre la plasticité de cette régulation.

VI. CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces travaux de recherche ont mené à l'identification d'un nouvel *enhancer* crucial pour la régulation de l'expression du gène *Nr5a1*, un facteur de transcription essentiel à la différenciation comme à la fonction gonadotrope. Les *enhancers* sont désormais placés au cœur des processus de différenciation et d'acquisition de l'identité cellulaire. Les connaissances acquises ici pourront non seulement aider à mieux comprendre la différenciation gonadotrope mais aussi à décrypter des mécanismes plus généraux de la différenciation cellulaire. Nous avons établi un lien entre deux régulateurs majeurs de la fonction gonadotrope, *i.e* *Nr5a1* et la signalisation œstrogénique. L'implication de la signalisation œstrogénique dans le processus de différenciation du lignage gonadotrope offre des pistes intéressantes pour l'étude de la spécification d'autres lignages stéroïdogènes exprimant *Nr5a1* comme les cellules cortico-surréaliennes ou les neurones du noyau ventro-médian de l'hypothalamus. Enfin, établir un lien entre la signalisation œstrogénique et la régulation de l'expression de *Nr5a1* pourrait s'avérer primordial pour expliquer des perturbations idiopathiques de la sphère endocrine, qu'elles soient endogènes (génétiques) ou environnementales (perturbateurs endocriniens).

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Adam, Rene C., Hanseul Yang, Yejing Ge, Nicole R. Infarinato, Shiri Gur-Cohen, Yuxuan Miao, Ping Wang, et al. « NFI Transcription Factors Provide Chromatin Access to Maintain Stem Cell Identity While Preventing Unintended Lineage Fate Choices ». *Nature Cell Biology* 22, n° 6 (juin 2020): 640-50. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0513-0>.
- Agger, Karl, Paul A. C. Cloos, Jesper Christensen, Diego Pasini, Simon Rose, Juri Rappsilber, Irina Issaeva, Eli Canaani, Anna Elisabetta Salcini, et Kristian Helin. « UTX and JMJD3 Are Histone H3K27 Demethylases Involved in HOX Gene Regulation and Development ». *Nature* 449, n° 7163 (11 octobre 2007): 731-34. <https://doi.org/10.1038/nature06145>.
- Alarid, E. T., J. J. Windle, D. B. Whyte, et P. L. Mellon. « Immortalization of Pituitary Cells at Discrete Stages of Development by Directed Oncogenesis in Transgenic Mice ». *Development (Cambridge, England)* 122, n° 10 (octobre 1996): 3319-29.
- Alim, Zahara, Cheryl Hartshorn, Oliver Mai, Iain Stitt, Colin Clay, Stuart Tobet, et Ulrich Boehm. « Gonadotrope Plasticity at Cellular and Population Levels ». *Endocrinology* 153, n° 10 (octobre 2012): 4729-39. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1360>.
- Allaerts, W., A. M. Tijssen, P. H. Jeucken, H. A. Drexhage, et J. de Koning. « Influence of Folliculo-Stellate Cells on Biphasic Luteinizing Hormone Secretion Response to Gonadotropin-Releasing Hormone in Rat Pituitary Cell Aggregates ». *European Journal of Endocrinology* 130, n° 5 (mai 1994): 530-39. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1300530>.
- Anamthathmakula, Prashanth, Chandra Suma Johnson Miryala, Rebecca S. Moreci, Chandrashekara Kyathanahalli, Sonia S. Hassan, Jennifer C. Condon, et Pancharatnam Jeyasuria. « Steroidogenic Factor 1 (Nr5a1) Is Required for Sertoli Cell Survival Post Sex Determination ». *Scientific Reports* 9, n° 1 (14 mars 2019): 4452. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41051-1>.
- Ando, Mitsushige, Masanori Goto, Masato Hojo, Aya Kita, Masashi Kitagawa, Toshiyuki Ohtsuka, Ryoichiro Kageyama, et Susumu Miyamoto. « The Proneural BHLH Genes Mash1, Math3 and NeuroD Are Required for Pituitary Development ». *Journal of Molecular Endocrinology* 61, n° 3 (1 octobre 2018): 127-38. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0090>.
- Andreu-Vieyra, Claudia V., Ruihong Chen, Julio E. Agno, Stefan Glaser, Konstantinos Anastassiadis, A. Francis Stewart, et Martin M. Matzuk. « MLL2 Is Required in Oocytes for Bulk Histone 3 Lysine 4 Trimethylation and Transcriptional Silencing ». *PLoS Biology* 8, n° 8 (17 août 2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000453>.
- Baek, Daehyun, Colleen Davis, Brent Ewing, David Gordon, et Phil Green. « Characterization and Predictive Discovery of Evolutionarily Conserved Mammalian Alternative Promoters ». *Genome Research* 17, n° 2 (février 2007): 145-55. <https://doi.org/10.1101/gr.5872707>.
- Baes, M., W. Allaerts, et C. Denef. « Evidence for Functional Communication between Folliculo-Stellate Cells and Hormone-Secreting Cells in Perfused Anterior Pituitary Cell Aggregates ». *Endocrinology* 120, n° 2 (février 1987): 685-91. <https://doi.org/10.1210/endo-120-2-685>.
- Bajrami, Emirjeta, et Mirko Spiroski. « Genomic Imprinting ». *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 4, n° 1 (15 mars 2016): 181-84. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.028>.
- Bakker, Julie, Christelle De Mees, Quentin Douhard, Jacques Balthazart, Philippe Gabant, Josiane Szpirer, et Claude Szpirer. « Alpha-Fetoprotein Protects the Developing Female Mouse Brain from Masculinization and Defeminization by Estrogens ». *Nature Neuroscience* 9, n° 2 (février 2006): 220-26. <https://doi.org/10.1038/nn1624>.
- Ballaré, Cecilia, Roser Zaurin, Guillermo P. Vicent, et Miguel Beato. « More Help than Hindrance: Nucleosomes Aid Transcriptional Regulation ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 4, n° 3 (juin 2013): 189-94. <https://doi.org/10.4161/nucl.25108>.
- Bannister, Andrew J., et Tony Kouzarides. « Regulation of Chromatin by Histone Modifications ». *Cell Research* 21, n° 3 (mars 2011): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Barkley, M. S., I. I. Geschwind, et G. E. Bradford. « The Gestational Pattern of Estradiol, Testosterone and Progesterone Secretion in Selected Strains of Mice ». *Biology of Reproduction* 20, n° 4 (mai 1979): 733-38. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.4.733>.
- Barton, N. H. « Genetic Hitchhiking ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355, n° 1403 (29 novembre 2000): 1553-62. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0716>.

- Belchetz, P. E., T. M. Plant, Y. Nakai, E. J. Keogh, et E. Knobil. « Hypophysial Responses to Continuous and Intermittent Delivery of Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone ». *Science (New York, N.Y.)* 202, n° 4368 (10 novembre 1978): 631-33. <https://doi.org/10.1126/science.100883>.
- Bell, Oliver, Vijay K. Tiwari, Nicolas H. Thomä, et Dirk Schübeler. « Determinants and Dynamics of Genome Accessibility ». *Nature Reviews. Genetics* 12, n° 8 (12 juillet 2011): 554-64. <https://doi.org/10.1038/nrg3017>.
- Ben-Hattar, J., et J. Jiricny. « Methylation of Single CpG Dinucleotides within a Promoter Element of the Herpes Simplex Virus Tk Gene Reduces Its Transcription in Vivo ». *Gene* 65, n° 2 (30 mai 1988): 219-27. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90458-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90458-1).
- Bernstein, Bradley E., Tarjei S. Mikkelsen, Xiaohui Xie, Michael Kamal, Dana J. Huebert, James Cuff, Ben Fry, et al. « A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 125, n° 2 (21 avril 2006): 315-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Bian, Chuanbing, Chao Xu, Jianbin Ruan, Kenneth K. Lee, Tara L. Burke, Wolfram Tempel, Dalia Barsyte, et al. « Sgf29 Binds Histone H3K4me2/3 and Is Required for SAGA Complex Recruitment and Histone H3 Acetylation ». *The EMBO Journal* 30, n° 14 (17 juin 2011): 2829-42. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.193>.
- Bingham, Nathan C., Sunita Verma-Kurvari, Luis F. Parada, et Keith L. Parker. « Development of a Steroidogenic Factor 1/Cre Transgenic Mouse Line ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 44, n° 9 (septembre 2006): 419-24. <https://doi.org/10.1002/dvg.20231>.
- Blackwood, E. M., et J. T. Kadonaga. « Going the Distance: A Current View of Enhancer Action ». *Science (New York, N.Y.)* 281, n° 5373 (3 juillet 1998): 60-63. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.60>.
- Bledau, Anita S., Kerstin Schmidt, Katrin Neumann, Undine Hill, Giovanni Ciotta, Ashish Gupta, David Coe Torres, et al. « The H3K4 Methyltransferase Setd1a Is First Required at the Epiblast Stage, Whereas Setd1b Becomes Essential after Gastrulation ». *Development (Cambridge, England)* 141, n° 5 (mars 2014): 1022-35. <https://doi.org/10.1242/dev.098152>.
- Bogdanović, Ozren, et Gert Jan C. Veenstra. « DNA Methylation and Methyl-CpG Binding Proteins: Developmental Requirements and Function ». *Chromosoma* 118, n° 5 (octobre 2009): 549-65. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0221-9>.
- Borgel, Julie, Sylvain Guibert, Yufeng Li, Hatsune Chiba, Dirk Schübeler, Hiroyuki Sasaki, Thierry Forné, et Michael Weber. « Targets and Dynamics of Promoter DNA Methylation during Early Mouse Development ». *Nature Genetics* 42, n° 12 (décembre 2010): 1093-1100. <https://doi.org/10.1038/ng.708>.
- Branon, Tess C., Justin A. Bosch, Ariana D. Sanchez, Namrata D. Udeshi, Tanya Svinkina, Steven A. Carr, Jessica L. Feldman, Norbert Perrimon, et Alice Y. Ting. « Efficient Proximity Labeling in Living Cells and Organisms with TurboID ». *Nature Biotechnology* 36, n° 9 (octobre 2018): 880-87. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>.
- Buaas, F. William, Jennifer R. Gardiner, Sally Clayton, Pierre Val, et Amanda Swain. « In Vivo Evidence for the Crucial Role of SF1 in Steroid-Producing Cells of the Testis, Ovary and Adrenal Gland ». *Development (Cambridge, England)* 139, n° 24 (décembre 2012): 4561-70. <https://doi.org/10.1242/dev.087247>.
- Büdefeld, T., S. A. Tobet, et G. Majdic. « Steroidogenic Factor 1 and the Central Nervous System ». *Journal of Neuroendocrinology* 24, n° 1 (janvier 2012): 225-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02174.x>.
- Büdefeld, Tomaz, Stuart A. Tobet, et Gregor Majdic. « Altered Position of Cell Bodies and Fibers in the Ventromedial Region in SF-1 Knockout Mice ». *Experimental Neurology* 232, n° 2 (décembre 2011): 176-84. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.021>.
- Budry, Lionel, Aurélio Balsalobre, Yves Gauthier, Konstantin Khetchoumian, Aurore L'honoré, Sophie Vallette, Thierry Brue, Dominique Figarella-Branger, Björn Meij, et Jacques Drouin. « The Selector Gene Pax7 Dictates Alternate Pituitary Cell Fates through Its Pioneer Action on Chromatin Remodeling ». *Genes & Development* 26, n° 20 (15 octobre 2012): 2299-2310. <https://doi.org/10.1101/gad.200436.112>.
- Budry, Lionel, Chrystel Lafont, Taoufik El Yandouzi, Norbert Chauvet, Geneviève Conéjero, Jacques Drouin, et Patrice Mollard. « Related Pituitary Cell Lineages Develop into Interdigitated 3D Cell Networks ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 30 (26 juillet 2011): 12515-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105929108>.
- Buenrostro, Jason D., Paul G. Giresi, Lisa C. Zaba, Howard Y. Chang, et William J. Greenleaf. « Transposition of Native Chromatin for Fast and Sensitive Epigenomic Profiling of Open Chromatin,

- DNA-Binding Proteins and Nucleosome Position ». *Nature Methods* 10, n° 12 (décembre 2013): 1213-18. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>.
- Bulger, M., et M. Groudine. « Looping versus Linking: Toward a Model for Long-Distance Gene Activation ». *Genes & Development* 13, n° 19 (1 octobre 1999): 2465-77. <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2465>.
- Burke, Zoë, et Guillermo Oliver. « Prox1 Is an Early Specific Marker for the Developing Liver and Pancreas in the Mammalian Foregut Endoderm ». *Mechanisms of Development* 118, n° 1-2 (octobre 2002): 147-55. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(02\)00240-x](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00240-x).
- Camper, S. A., T. L. Saunders, R. W. Katz, et R. H. Reeves. « The Pit-1 Transcription Factor Gene Is a Candidate for the Murine Snell Dwarf Mutation ». *Genomics* 8, n° 3 (novembre 1990): 586-90. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(90\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0888-7543(90)90050-5).
- Carninci, Piero, Albin Sandelin, Boris Lenhard, Shintaro Katayama, Kazuro Shimokawa, Jasmina Ponjavic, Colin A. M. Semple, et al. « Genome-Wide Analysis of Mammalian Promoter Architecture and Evolution ». *Nature Genetics* 38, n° 6 (juin 2006): 626-35. <https://doi.org/10.1038/ng1789>.
- Carroll, Jason S., Clifford A. Meyer, Jun Song, Wei Li, Timothy R. Geistlinger, Jérôme Eeckhoute, Alexander S. Brodsky, et al. « Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor Binding Sites ». *Nature Genetics* 38, n° 11 (novembre 2006): 1289-97. <https://doi.org/10.1038/ng1901>.
- Charles, Michael A., Thomas L. Saunders, William M. Wood, Kailey Owens, A. F. Parlow, Sally A. Camper, E. C. Ridgway, et David F. Gordon. « Pituitary-Specific Gata2 Knockout: Effects on Gonadotrope and Thyrotrope Function ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20, n° 6 (juin 2006): 1366-77. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0378>.
- Chen, Xiaoying, Jennica L. Zaro, et Wei-Chiang Shen. « Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, n° 10 (octobre 2013): 1357-69. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>.
- Chepelev, Iouri, Gang Wei, Dara Wangsa, Qingsong Tang, et Keji Zhao. « Characterization of Genome-Wide Enhancer-Promoter Interactions Reveals Co-Expression of Interacting Genes and Modes of Higher Order Chromatin Organization ». *Cell Research* 22, n° 3 (mars 2012): 490-503. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.15>.
- Cherrington, Brian D., Janice S. Bailey, Alejandro L. Diaz, et Pamela L. Mellon. « NeuroD1 and Mash1 Temporally Regulate GnRH Receptor Gene Expression in Immortalized Mouse Gonadotrope Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 295, n° 1-2 (25 novembre 2008): 106-14. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.017>.
- Cheung, Leonard Y. M., Akima S. George, Stacey R. McGee, Alexandre Z. Daly, Michelle L. Brinkmeier, Buffy S. Ellsworth, et Sally A. Camper. « Single-Cell RNA Sequencing Reveals Novel Markers of Male Pituitary Stem Cells and Hormone-Producing Cell Types ». *Endocrinology* 159, n° 12 (1 décembre 2018): 3910-24. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00750>.
- Childs, G. V., G. Unabia, B. L. Lee, et D. Rougeau. « Heightened Secretion by Small and Medium-Sized Luteinizing Hormone (LH) Gonadotropes Late in the Cycle Suggests Contributions to the LH Surge or Possible Paracrine Interactions ». *Endocrinology* 130, n° 1 (janvier 1992): 345-52. <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1727708>.
- Choukrallah, Mohamed-Amin, Shuang Song, Antonius G. Rolink, Lukas Burger, et Patrick Matthias. « Enhancer Repertoires Are Reshaped Independently of Early Priming and Heterochromatin Dynamics during B Cell Differentiation ». *Nature Communications* 6 (19 octobre 2015): 8324. <https://doi.org/10.1038/ncomms9324>.
- Cicatiello, Luigi, Margherita Mutarelli, Oli M. V. Grober, Ornella Paris, Lorenzo Ferraro, Maria Ravo, Roberta Tarallo, et al. « Estrogen Receptor Alpha Controls a Gene Network in Luminal-like Breast Cancer Cells Comprising Multiple Transcription Factors and MicroRNAs ». *The American Journal of Pathology* 176, n° 5 (mai 2010): 2113-30. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090837>.
- Cocquet, J., E. Pailhoux, F. Jaubert, N. Servel, X. Xia, M. Pannetier, E. De Baere, et al. « Evolution and Expression of FOXL2 ». *Journal of Medical Genetics* 39, n° 12 (décembre 2002): 916-21. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.12.916>.
- Conaway, Joan Weliky, Laurence Florens, Shigeo Sato, Chieri Tomomori-Sato, Tari J. Parmely, Tingting Yao, Selene K. Swanson, Charles A. S. Banks, Michael P. Washburn, et Ronald C. Conaway. « The Mammalian Mediator Complex ». *FEBS Letters* 579, n° 4 (7 février 2005): 904-8. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.031>.
- Corradin, Olivia, Alina Saiakhova, Batool Akhtar-Zaidi, Lois Myeroff, Joseph Willis, Richard Cowper-Salari, Mathieu Lupien, Sanford Markowitz, et Peter C. Scacheri. « Combinatorial Effects of Multiple Enhancer Variants in Linkage Disequilibrium Dictate Levels of Gene Expression to Confer

- Susceptibility to Common Traits ». *Genome Research* 24, n° 1 (janvier 2014): 1-13. <https://doi.org/10.1101/gr.164079.113>.
- Coss, Djurdjica. « Regulation of Reproduction via Tight Control of Gonadotropin Hormone Levels ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 463 (5 mars 2018): 116-30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.022>.
- Counis, Raymond, Jean-Noël Laverrière, Ghislaine Garrel, Christian Bleux, Joëlle Cohen-Tannoudji, Yannick Lerrant, Marie-Laure Kottler, et Solange Magre. « Gonadotropin-Releasing Hormone and the Control of Gonadotrope Function ». *Reproduction, Nutrition, Development* 45, n° 3 (juin 2005): 243-54. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005017>.
- Creyghton, Menno P., Albert W. Cheng, G. Grant Welstead, Tristan Kooistra, Bryce W. Carey, Eveline J. Steine, Jacob Hanna, et al. « Histone H3K27ac Separates Active from Poised Enhancers and Predicts Developmental State ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 50 (14 décembre 2010): 21931-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>.
- Dalkin, A. C., D. J. Haisenleder, G. A. Ortolano, T. R. Ellis, et J. C. Marshall. « The Frequency of Gonadotropin-Releasing-Hormone Stimulation Differentially Regulates Gonadotropin Subunit Messenger Ribonucleic Acid Expression ». *Endocrinology* 125, n° 2 (août 1989): 917-24. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-917>.
- Dasen, J. S., S. M. O'Connell, S. E. Flynn, M. Treier, A. S. Gleiberman, D. P. Szeto, F. Hooshmand, A. K. Aggarwal, et M. G. Rosenfeld. « Reciprocal Interactions of Pit1 and GATA2 Mediate Signaling Gradient-Induced Determination of Pituitary Cell Types ». *Cell* 97, n° 5 (28 mai 1999): 587-98. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80770-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80770-9).
- Dasen, J. S., et M. G. Rosenfeld. « Combinatorial Codes in Signaling and Synergy: Lessons from Pituitary Development ». *Current Opinion in Genetics & Development* 9, n° 5 (octobre 1999): 566-74. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(99\)00015-5](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(99)00015-5).
- Dasen, J. S., et M. G. Rosenfeld. « Signaling and Transcriptional Mechanisms in Pituitary Development ». *Annual Review of Neuroscience* 24 (2001): 327-55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.327>.
- Davuluri, Ramana V., Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Christoph Plass, et Tim H.-M. Huang. « The Functional Consequences of Alternative Promoter Use in Mammalian Genomes ». *Trends in Genetics: TIG* 24, n° 4 (avril 2008): 167-77. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.01.008>.
- De Mees, Christelle, Jean-François Laes, Julie Bakker, Johan Smitz, Benoît Henny, Pascale Van Vooren, Philippe Gabant, Josiane Szpirer, et Claude Szpirer. « Alpha-Fetoprotein Controls Female Fertility and Prenatal Development of the Gonadotropin-Releasing Hormone Pathway through an Antiestrogenic Action ». *Molecular and Cellular Biology* 26, n° 5 (mars 2006): 2012-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.5.2012-2018.2006>.
- De Santa, Francesca, Iros Barozzi, Flore Mietton, Serena Ghisletti, Sara Polletti, Betsabeh Khoramian Tusi, Heiko Muller, Jiannis Ragoussis, Chia-Lin Wei, et Gioacchino Natoli. « A Large Fraction of Extragenic RNA Pol II Transcription Sites Overlap Enhancers ». *PLoS Biology* 8, n° 5 (11 mai 2010): e1000384. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000384>.
- Denissov, Sergei, Helmut Hofemeister, Hendrik Marks, Andrea Kranz, Giovanni Ciotta, Sukhdeep Singh, Konstantinos Anastassiadis, Hendrik G. Stunnenberg, et A. Francis Stewart. « Mll2 Is Required for H3K4 Trimethylation on Bivalent Promoters in Embryonic Stem Cells, Whereas Mll1 Is Redundant ». *Development (Cambridge, England)* 141, n° 3 (février 2014): 526-37. <https://doi.org/10.1242/dev.102681>.
- Deplus, Rachel, Carmen Brenner, Wendy A. Burgers, Pascale Putmans, Tony Kouzarides, Yvan de Launoit, et François Fuks. « Dnmt3L Is a Transcriptional Repressor That Recruits Histone Deacetylase ». *Nucleic Acids Research* 30, n° 17 (1 septembre 2002): 3831-38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf509>.
- Devnath, S., et K. Inoue. « An Insight to Pituitary Folliculo-Stellate Cells ». *Journal of Neuroendocrinology* 20, n° 6 (juin 2008): 687-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01716.x>.
- Donaghey, Julie, Sudhir Thakurela, Jocelyn Charlton, Jennifer S. Chen, Zachary D. Smith, Hongcang Gu, Ramona Pop, et al. « Genetic Determinants and Epigenetic Effects of Pioneer-Factor Occupancy ». *Nature Genetics* 50, n° 2 (février 2018): 250-58. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0034-3>.
- Elgin, S. C. « The Formation and Function of DNase I Hypersensitive Sites in the Process of Gene Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 263, n° 36 (25 décembre 1988): 19259-62.

- Ellsworth, Buffy S., Ann T. Burns, Kenneth W. Escudero, Dawn L. Duval, Scott E. Nelson, et Colin M. Clay. « The Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Receptor Activating Sequence (GRAS) Is a Composite Regulatory Element That Interacts with Multiple Classes of Transcription Factors Including Smads, AP-1 and a Forkhead DNA Binding Protein ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 206, n° 1-2 (29 août 2003): 93-111. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(03\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(03)00235-1).
- Ellsworth, Buffy S., Noboru Egashira, Jodi L. Haller, Darcy L. Butts, Julie Cocquet, Colin M. Clay, Robert Y. Osamura, et Sally A. Camper. « FOXL2 in the Pituitary: Molecular, Genetic, and Developmental Analysis ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20, n° 11 (novembre 2006): 2796-2805. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0303>.
- ENCODE Project Consortium. « An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome ». *Nature* 489, n° 7414 (6 septembre 2012): 57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>.
- ENCODE Project Consortium, Ewan Birney, John A. Stamatoyannopoulos, Anindya Dutta, Roderic Guigó, Thomas R. Gingeras, Elliott H. Margulies, et al. « Identification and Analysis of Functional Elements in 1% of the Human Genome by the ENCODE Pilot Project ». *Nature* 447, n° 7146 (14 juin 2007): 799-816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>.
- Engelen, Erik, Umut Akinci, Jan Christian Bryne, Jun Hou, Cristina Gontan, Maaikje Moen, Dorota Szumska, et al. « Sox2 Cooperates with Chd7 to Regulate Genes That Are Mutated in Human Syndromes ». *Nature Genetics* 43, n° 6 (juin 2011): 607-11. <https://doi.org/10.1038/ng.825>.
- Ericson, J., S. Norlin, T. M. Jessell, et T. Edlund. « Integrated FGF and BMP Signaling Controls the Progression of Progenitor Cell Differentiation and the Emergence of Pattern in the Embryonic Anterior Pituitary ». *Development (Cambridge, England)* 125, n° 6 (mars 1998): 1005-15.
- Espinosa, J. M., et B. M. Emerson. « Transcriptional Regulation by P53 through Intrinsic DNA/Chromatin Binding and Site-Directed Cofactor Recruitment ». *Molecular Cell* 8, n° 1 (juillet 2001): 57-69. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00283-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00283-0).
- Evans, J. J., W. Forrest-Owen, et C. A. McArdle. « Oxytocin Receptor-Mediated Activation of Phosphoinositidase C and Elevation of Cytosolic Calcium in the Gonadotrope-Derived AlphaT3-1 Cell Line ». *Endocrinology* 138, n° 5 (mai 1997): 2049-55. <https://doi.org/10.1210/endo.138.5.5138>.
- Fatchiyah, null, Mohamad Zubair, Yuichi Shima, Sanae Oka, Satoru Ishihara, Yuko Fukui-Katoh, et Ken-ichirou Morohashi. « Differential Gene Dosage Effects of Ad4BP/SF-1 on Target Tissue Development ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, n° 4 (24 mars 2006): 1036-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.058>.
- Feng, Suhua, Shawn J. Cokus, Xiaoyu Zhang, Pao-Yang Chen, Magnolia Bostick, Mary G. Goll, Jonathan Hetzel, et al. « Conservation and Divergence of Methylation Patterning in Plants and Animals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n° 19 (11 mai 2010): 8689-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>.
- Ferrari, Karin J., Andrea Scelfo, Sriganesh Jammula, Alessandro Cuomo, Iros Barozzi, Alexandra Stützer, Wolfgang Fischle, Tiziana Bonaldi, et Diego Pasini. « Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity ». *Molecular Cell* 53, n° 1 (9 janvier 2014): 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030>.
- Flach, Koen D., et Wilbert Zwart. « The First Decade of Estrogen Receptor Cistromics in Breast Cancer ». *The Journal of Endocrinology* 229, n° 2 (mai 2016): R43-56. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0003>.
- Flanagan, John F., Li-Zhi Mi, Maksymilian Chruszcz, Marcin Cymborowski, Katrina L. Clines, Youngchang Kim, Wladek Minor, Fraydoon Rastinejad, et Sepideh Khorasanizadeh. « Double Chromodomains Cooperate to Recognize the Methylated Histone H3 Tail ». *Nature* 438, n° 7071 (22 décembre 2005): 1181-85. <https://doi.org/10.1038/nature04290>.
- Fletcher, Patrick A., Kosara Smiljanic, Rafael Maso Prévède, James R. Iben, Tianwei Li, Milos B. Rokic, Arthur Sherman, Steven L. Coon, et Stanko S. Stojilkovic. « Cell Type- and Sex-Dependent Transcriptome Profiles of Rat Anterior Pituitary Cells ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (18 septembre 2019). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00623>.
- Fuks, F., W. A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies, et T. Kouzarides. « DNA Methyltransferase Dnmt1 Associates with Histone Deacetylase Activity ». *Nature Genetics* 24, n° 1 (janvier 2000): 88-91. <https://doi.org/10.1038/71750>.
- Fuks, F., W. A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, et T. Kouzarides. « Dnmt3a Binds Deacetylases and Is Recruited by a Sequence-Specific Repressor to Silence Transcription ». *The EMBO Journal* 20, n° 10 (15 mai 2001): 2536-44. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2536>.
- Galloway, Jamie R., Maigen Bethea, Yanping Liu, Rachel Underwood, James A. Mobley, et Chad S. Hunter. « SSBP3 Interacts With Islet-1 and Ldb1 to Impact Pancreatic β -Cell Target Genes ».

- Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 29, n° 12 (décembre 2015): 1774-86. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1165>.
- Gao, Rui, Xingqun Liang, Sirisha Cheedipudi, Julio Cordero, Xue Jiang, Qingquan Zhang, Luca Caputo, et al. « Pioneering Function of Isl1 in the Epigenetic Control of Cardiomyocyte Cell Fate ». *Cell Research* 29, n° 6 (juin 2019): 486-501. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0168-1>.
- Gaszner, Miklos, et Gary Felsenfeld. « Insulators: Exploiting Transcriptional and Epigenetic Mechanisms ». *Nature Reviews. Genetics* 7, n° 9 (septembre 2006): 703-13. <https://doi.org/10.1038/nrg1925>.
- Gay, F., I. Anglade, Z. Gong, et G. Salbert. « The LIM/Homeodomain Protein Islet-1 Modulates Estrogen Receptor Functions ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14, n° 10 (octobre 2000): 1627-48. <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0538>.
- Gieske, Mary C., Hyun Joon Kim, Sandra J. Legan, Yongbum Koo, Andree Krust, Pierre Chambon, et CheMyong Ko. « Pituitary Gonadotroph Estrogen Receptor- α Is Necessary for Fertility in Females ». *Endocrinology* 149, n° 1 (janvier 2008): 20-27. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1084>.
- Gleiberman, A. S., N. G. Fedtsova, et M. G. Rosenfeld. « Tissue Interactions in the Induction of Anterior Pituitary: Role of the Ventral Diencephalon, Mesenchyme, and Notochord ». *Developmental Biology* 213, n° 2 (15 septembre 1999): 340-53. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9386>.
- Goode, Debbie K., Nadine Obier, M. S. Vijayabaskar, Michael Lie-A-Ling, Andrew J. Lilly, Rebecca Hannah, Monika Lichtinger, et al. « Dynamic Gene Regulatory Networks Drive Hematopoietic Specification and Differentiation ». *Developmental Cell* 36, n° 5 (7 mars 2016): 572-87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.01.024>.
- Granger, Anne, Valérie Ngô-Muller, Christian Bleux, Céline Guigon, Hanna Pincas, Solange Magre, Dominique Daegelen, Andrée Tixier-Vidal, Raymond Counis, et Jean-Noël Laverrière. « The Promoter of the Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene Directs the Expression of the Human Placental Alkaline Phosphatase Reporter Gene in Gonadotrope Cells in the Anterior Pituitary Gland as Well as in Multiple Extrapituitary Tissues ». *Endocrinology* 145, n° 2 (février 2004): 983-93. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0881>.
- Gross, D. S., et W. T. Garrard. « Nuclease Hypersensitive Sites in Chromatin ». *Annual Review of Biochemistry* 57 (1988): 159-97. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.001111>.
- Guenther, Matthew G., Stuart S. Levine, Laurie A. Boyer, Rudolf Jaenisch, et Richard A. Young. « A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells ». *Cell* 130, n° 1 (13 juillet 2007): 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.042>.
- Han, W.-D., Y.-M. Mu, X.-C. Lu, Z.-M. Xu, X.-J. Li, L. Yu, H.-J. Song, et al. « Up-Regulation of LRP16 mRNA by 17 β -Estradiol through Activation of Estrogen Receptor Alpha (ER α), but Not ER β , and Promotion of Human Breast Cancer MCF-7 Cell Proliferation: A Preliminary Report ». *Endocrine-Related Cancer* 10, n° 2 (juin 2003): 217-24. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100217>.
- Han, W.-D., Y.-L. Zhao, Y.-G. Meng, L. Zang, Z.-Q. Wu, Q. Li, Y.-L. Si, et al. « Estrogenically Regulated LRP16 Interacts with Estrogen Receptor Alpha and Enhances the Receptor's Transcriptional Activity ». *Endocrine-Related Cancer* 14, n° 3 (septembre 2007): 741-53. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0082>.
- Hata, Kenichiro, Masaki Okano, Hong Lei, et En Li. « Dnmt3L Cooperates with the Dnmt3 Family of de Novo DNA Methyltransferases to Establish Maternal Imprints in Mice ». *Development (Cambridge, England)* 129, n° 8 (avril 2002): 1983-93.
- Hatton, G. I. « Pituicytes, Glia and Control of Terminal Secretion ». *The Journal of Experimental Biology* 139 (septembre 1988): 67-79.
- He, Housheng Hansen, Clifford A. Meyer, Mei Wei Chen, V. Craig Jordan, Myles Brown, et X. Shirley Liu. « Differential DNase I Hypersensitivity Reveals Factor-Dependent Chromatin Dynamics ». *Genome Research* 22, n° 6 (juin 2012): 1015-25. <https://doi.org/10.1101/gr.133280.111>.
- Héberlé, Éléa, et Anaïs Flore Bardet. « Sensitivity of Transcription Factors to DNA Methylation ». *Essays in Biochemistry* 63, n° 6 (20 décembre 2019): 727-41. <https://doi.org/10.1042/EBC20190033>.
- Heintzman, Nathaniel D., Rhona K. Stuart, Gary Hon, Yutao Fu, Christina W. Ching, R. David Hawkins, Leah O. Barrera, et al. « Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome ». *Nature Genetics* 39, n° 3 (mars 2007): 311-18. <https://doi.org/10.1038/ng1966>.
- Heinz, Sven, Christopher Benner, Nathanael Spann, Eric Bertolino, Yin C. Lin, Peter Laslo, Jason X. Cheng, Cornelis Murre, Harinder Singh, et Christopher K. Glass. « Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime Cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B

- Cell Identities ». *Molecular Cell* 38, n° 4 (28 mai 2010): 576-89. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>.
- Henderson, Helen L., Julie Townsend, et Domingo J. Tortorese. « Direct Effects of Prolactin and Dopamine on the Gonadotroph Response to GnRH ». *The Journal of Endocrinology* 197, n° 2 (mai 2008): 343-50. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0536>.
- Hewitt, Sylvia C., Leping Li, Sara A. Grimm, Yu Chen, Liwen Liu, Yin Li, Pierre R. Bushel, David Fargo, et Kenneth S. Korach. « Research Resource: Whole-Genome Estrogen Receptor α Binding in Mouse Uterine Tissue Revealed by ChIP-Seq ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 26, n° 5 (mai 2012): 887-98. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1311>.
- Hobkirk, R., J. M. Fletcher, et H. Y. Choi. « Estrone Sulfate Sulfohydrolase in the Developing Brain and Pituitary of Rat, Mouse and Guinea Pig ». *Journal of Steroid Biochemistry* 26, n° 3 (mars 1987): 413-16. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(87\)90109-9](https://doi.org/10.1016/0022-4731(87)90109-9).
- Holliday, R., et J. E. Pugh. « DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development ». *Science (New York, N.Y.)* 187, n° 4173 (24 janvier 1975): 226-32.
- Honda, S., K. Morohashi, M. Nomura, H. Takeya, M. Kitajima, et T. Omura. « Ad4BP Regulating Steroidogenic P-450 Gene Is a Member of Steroid Hormone Receptor Superfamily ». *The Journal of Biological Chemistry* 268, n° 10 (5 avril 1993): 7494-7502.
- Hsu, H.-T., H.-M. Chen, Z. Yang, J. Wang, N. K. Lee, A. Burger, K. Zaret, T. Liu, E. Levine, et S. E. Mango. « TRANSCRIPTION. Recruitment of RNA Polymerase II by the Pioneer Transcription Factor PHA-4 ». *Science (New York, N.Y.)* 348, n° 6241 (19 juin 2015): 1372-76. <https://doi.org/10.1126/science.aab1223>.
- Hu, Shaohui, Jun Wan, Yijing Su, Qifeng Song, Yaxue Zeng, Ha Nam Nguyen, Jaehoon Shin, et al. « DNA Methylation Presents Distinct Binding Sites for Human Transcription Factors ». *ELife* 2 (3 septembre 2013): e00726. <https://doi.org/10.7554/eLife.00726>.
- Hübner, M. R., et D. L. Spector. « Role of H3K27 Demethylases Jmjd3 and UTX in Transcriptional Regulation ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75 (2010): 43-49. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.020>.
- Hurtado, Antoni, Kelly A. Holmes, Caryn S. Ross-Innes, Dominic Schmidt, et Jason S. Carroll. « FOXA1 Is a Key Determinant of Estrogen Receptor Function and Endocrine Response ». *Nature Genetics* 43, n° 1 (janvier 2011): 27-33. <https://doi.org/10.1038/ng.730>.
- Iguchi-Ariga, S. M., et W. Schaffner. « CpG Methylation of the CAMP-Responsive Enhancer/Promoter Sequence TGACGTC A Abolishes Specific Factor Binding as Well as Transcriptional Activation ». *Genes & Development* 3, n° 5 (mai 1989): 612-19. <https://doi.org/10.1101/gad.3.5.612>.
- Ikeda, Y., X. Luo, R. Abbud, J. H. Nilson, et K. L. Parker. « The Nuclear Receptor Steroidogenic Factor 1 Is Essential for the Formation of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 9, n° 4 (avril 1995): 478-86. <https://doi.org/10.1210/mend.9.4.7659091>.
- Ingraham, H. A., D. S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, W. H. Shen, M. W. Nachtigal, R. Abbud, J. H. Nilson, et K. L. Parker. « The Nuclear Receptor Steroidogenic Factor 1 Acts at Multiple Levels of the Reproductive Axis ». *Genes & Development* 8, n° 19 (1 octobre 1994): 2302-12. <https://doi.org/10.1101/gad.8.19.2302>.
- Itzhak, Daniel N., Francesca Sacco, Nagarjuna Nagaraj, Stefa Tyanova, Matthias Mann, et Marta Murgia. « SILAC-Based Quantitative Proteomics Using Mass Spectrometry Quantifies Endoplasmic Reticulum Stress in Whole HeLa Cells ». *Disease Models & Mechanisms* 12, n° 11 (11 novembre 2019). <https://doi.org/10.1242/dmm.040741>.
- Iwafuchi-Doi, Makiko. « The Mechanistic Basis for Chromatin Regulation by Pioneer Transcription Factors ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 11, n° 1 (janvier 2019): e1427. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1427>.
- Iwafuchi-Doi, Makiko, Greg Donahue, Akshay Kakumanu, Jason A. Watts, Shaun Mahony, B. Franklin Pugh, Dolim Lee, Klaus H. Kaestner, et Kenneth S. Zaret. « The Pioneer Transcription Factor FoxA Maintains an Accessible Nucleosome Configuration at Enhancers for Tissue-Specific Gene Activation ». *Molecular Cell* 62, n° 1 (7 avril 2016): 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.001>.
- Iwafuchi-Doi, Makiko, et Kenneth S. Zaret. « Pioneer Transcription Factors in Cell Reprogramming ». *Genes & Development* 28, n° 24 (15 décembre 2014): 2679-92. <https://doi.org/10.1101/gad.253443.114>.
- Iyer, Vishwanath R. « Nucleosome Positioning: Bringing Order to the Eukaryotic Genome ». *Trends in Cell Biology* 22, n° 5 (mai 2012): 250-56. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.004>.

- Jaber, B. M., R. Mukopadhyay, et C. L. Smith. « Estrogen Receptor-Alpha Interaction with the CREB Binding Protein Coactivator Is Regulated by the Cellular Environment ». *Journal of Molecular Endocrinology* 32, n° 1 (février 2004): 307-23. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0320307>.
- Jeong, Kyeong-Hoon, William W. Chin, et Ursula B. Kaiser. « Essential Role of the Homeodomain for Pituitary Homeobox 1 Activation of Mouse Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene Expression through Interactions with c-Jun and DNA ». *Molecular and Cellular Biology* 24, n° 14 (juillet 2004): 6127-39. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6127-6139.2004>.
- Jeong, S., et A. Stein. « Micrococcal Nuclease Digestion of Nuclei Reveals Extended Nucleosome Ladders Having Anomalous DNA Lengths for Chromatin Assembled on Non-Replicating Plasmids in Transfected Cells ». *Nucleic Acids Research* 22, n° 3 (11 février 1994): 370-75. <https://doi.org/10.1093/nar/22.3.370>.
- Jeyasuria, Pancharatnam, Yayoi Ikeda, Soazik P. Jamin, Liping Zhao, Dirk G. De Rooij, Axel P. N. Themmen, Richard R. Behringer, et Keith L. Parker. « Cell-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 Reveals Its Essential Roles in Gonadal Function ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18, n° 7 (juillet 2004): 1610-19. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0404>.
- Jiang, Guojuan, Wanglong Deng, Yang Liu, et Chengde Wang. « General Mechanism of JQ1 in Inhibiting Various Types of Cancer ». *Molecular Medicine Reports* 21, n° 3 (mars 2020): 1021-34. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10927>.
- Jones, Peter A. « Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and Beyond ». *Nature Reviews. Genetics* 13, n° 7 (29 mai 2012): 484-92. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>.
- Jozwik, Kamila M., Igor Chernukhin, Aurelien A. Serandour, Sankari Nagarajan, et Jason S. Carroll. « FOXA1 Directs H3K4 Monomethylation at Enhancers via Recruitment of the Methyltransferase MLL3 ». *Cell Reports* 17, n° 10 (6 décembre 2016): 2715-23. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.028>.
- Justice, Nicholas J., Amy L. Blount, Emanuele Pelosi, David Schlessinger, Wylie Vale, et Louise M. Bilezikjian. « Impaired FSHbeta Expression in the Pituitaries of Foxl2 Mutant Animals ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 25, n° 8 (août 2011): 1404-15. <https://doi.org/10.1210/me.2011-0093>.
- Karpova, Tatiana, Jeremy Presley, Rengasamy R. Manimaran, Serge P. Scherrer, Lovella Tejada, Kenneth R. Peterson, et Leslie L. Heckert. « A FTZ-F1-Containing Yeast Artificial Chromosome Recapitulates Expression of Steroidogenic Factor 1 in Vivo ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19, n° 10 (octobre 2005): 2549-63. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0386>.
- Kawamura, Kosuke, Tom Kouki, Genri Kawahara, et Sakae Kikuyama. « Hypophyseal Development in Vertebrates from Amphibians to Mammals ». *General and Comparative Endocrinology* 126, n° 2 (avril 2002): 130-35. <https://doi.org/10.1006/gcen.2002.7784>.
- Kebede, Adam F., Robert Schneider, et Sylvain Daujat. « Novel Types and Sites of Histone Modifications Emerge as Players in the Transcriptional Regulation Contest ». *The FEBS Journal* 282, n° 9 (mai 2015): 1658-74. <https://doi.org/10.1111/febs.13047>.
- Keegan, Catherine E., et Gary D. Hammer. « Recent Insights into Organogenesis of the Adrenal Cortex ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 13, n° 5 (juillet 2002): 200-208. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(02\)00602-1](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(02)00602-1).
- Kelberman, Daniel, Karine Rizzoti, Robin Lovell-Badge, Iain C. A. F. Robinson, et Meहुल T. Dattani. « Genetic Regulation of Pituitary Gland Development in Human and Mouse ». *Endocrine Reviews* 30, n° 7 (décembre 2009): 790-829. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0008>.
- Kim, Dae In, K. C. Birendra, Wenhong Zhu, Khatereh Motamedchaboki, Valérie Doye, et Kyle J. Roux. « Probing Nuclear Pore Complex Architecture with Proximity-Dependent Biotinylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, n° 24 (17 juin 2014): E2453-2461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406459111>.
- Kim, Dae In, Samuel C. Jensen, Kyle A. Noble, Birendra Kc, Kenneth H. Roux, Khatereh Motamedchaboki, et Kyle J. Roux. « An Improved Smaller Biotin Ligase for BioID Proximity Labeling ». *Molecular Biology of the Cell* 27, n° 8 (15 avril 2016): 1188-96. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0844>.
- Kim, Hyung-Goo, Jennifer Pedersen-White, Balasubramanian Bhagavath, et Lawrence C. Layman. « Genotype and Phenotype of Patients with Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Mutations ». *Frontiers of Hormone Research* 39 (2010): 94-110. <https://doi.org/10.1159/000312696>.
- Kim, Ki Woo, Shen Li, Hongyu Zhao, Boya Peng, Stuart A. Tobet, Joel K. Elmquist, Keith L. Parker, et Liping Zhao. « CNS-Specific Ablation of Steroidogenic Factor 1 Results in Impaired Female

- Reproductive Function ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 24, n° 6 (juin 2010): 1240-50. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0206>.
- Kim, So-Youn, Jeffrey Weiss, Minghan Tong, Monica M. Laronda, Eun-Jig Lee, et J. Larry Jameson. « Foxl2, a Forkhead Transcription Factor, Modulates Nonclassical Activity of the Estrogen Receptor-Alpha ». *Endocrinology* 150, n° 11 (novembre 2009): 5085-93. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0313>.
- Kimura, Kouichi, Ai Wakamatsu, Yutaka Suzuki, Toshio Ota, Tetsuo Nishikawa, Riu Yamashita, Jun-ichi Yamamoto, et al. « Diversification of Transcriptional Modulation: Large-Scale Identification and Characterization of Putative Alternative Promoters of Human Genes ». *Genome Research* 16, n° 1 (janvier 2006): 55-65. <https://doi.org/10.1101/gr.4039406>.
- Kimura, R., H. Yoshii, M. Nomura, N. Kotomura, T. Mukai, S. Ishihara, K. Ohba, et al. « Identification of Novel First Exons in Ad4BP/SF-1 (NR5A1) Gene and Their Tissue- and Species-Specific Usage ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, n° 1 (11 novembre 2000): 63-71. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3774>.
- King, Hamish W., et Robert J. Klose. « The Pioneer Factor OCT4 Requires the Chromatin Remodeller BRG1 to Support Gene Regulatory Element Function in Mouse Embryonic Stem Cells ». *ELife* 6 (13 mars 2017). <https://doi.org/10.7554/eLife.22631>.
- Kivelä, Riikka, Ida Salmela, Yen Hoang Nguyen, Tatiana V. Petrova, Heikki A. Koistinen, Zoltan Wiener, et Kari Alitalo. « The Transcription Factor Prox1 Is Essential for Satellite Cell Differentiation and Muscle Fibre-Type Regulation ». *Nature Communications* 7 (12 octobre 2016): 13124. <https://doi.org/10.1038/ncomms13124>.
- Kloet, Susan L., Matthew M. Makowski, H. Irem Baymaz, Lisa van Voorthuijsen, Ino D. Karemaker, Alexandra Santanach, Pascal W. T. C. Jansen, Luciano Di Croce, et Michiel Vermeulen. « The Dynamic Interactome and Genomic Targets of Polycomb Complexes during Stem-Cell Differentiation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23, n° 7 (juillet 2016): 682-90. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3248>.
- Kok, Y. J. de, E. R. Vossenaar, C. W. Cremers, N. Dahl, J. Laporte, L. J. Hu, D. Lacombe, et al. « Identification of a Hot Spot for Microdeletions in Patients with X-Linked Deafness Type 3 (DFN3) 900 Kb Proximal to the DFN3 Gene POU3F4 ». *Human Molecular Genetics* 5, n° 9 (septembre 1996): 1229-35. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.9.1229>.
- Kouki, T., H. Imai, K. Aoto, K. Eto, S. Shioda, K. Kawamura, et S. Kikuyama. « Developmental Origin of the Rat Adenohypophysis Prior to the Formation of Rathke's Pouch ». *Development (Cambridge, England)* 128, n° 6 (mars 2001): 959-63.
- Kouzarides, Tony. « Chromatin Modifications and Their Function ». *Cell* 128, n° 4 (23 février 2007): 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- Krishnakumar, Raga, Amy F. Chen, Marisol G. Pantovich, Muhammad Danial, Ronald J. Parchem, Patricia A. Labosky, et Robert Blelloch. « FOXD3 Regulates Pluripotent Stem Cell Potential by Simultaneously Initiating and Repressing Enhancer Activity ». *Cell Stem Cell* 18, n° 1 (7 janvier 2016): 104-17. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.10.003>.
- Krivega, Ivan, et Ann Dean. « Enhancer and Promoter Interactions-Long Distance Calls ». *Current Opinion in Genetics & Development* 22, n° 2 (avril 2012): 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.11.001>.
- Krylova, Irina N., Elena P. Sablin, Jamie Moore, Robert X. Xu, Gregory M. Waitt, J. Andrew MacKay, Dalia Juzumiene, et al. « Structural Analyses Reveal Phosphatidyl Inositols as Ligands for the NR5 Orphan Receptors SF-1 and LRH-1 ». *Cell* 120, n° 3 (11 février 2005): 343-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.024>.
- Kusakabe, Moriaki, Teruyo Sakakura, Masao Sano, et Yasuaki Nishizuka. « Early Development of Mouse Anterior Pituitary: Role of Mesenchyme ». *Development, Growth & Differentiation* 26, n° 3 (1984): 263-71. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1984.00263.x>.
- Kuzmichev, Andrei, Kenichi Nishioka, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, et Danny Reinberg. « Histone Methyltransferase Activity Associated with a Human Multiprotein Complex Containing the Enhancer of Zeste Protein ». *Genes & Development* 16, n° 22 (15 novembre 2002): 2893-2905. <https://doi.org/10.1101/gad.1035902>.
- Kwon, Gloria S., Stuart T. Fraser, Guy S. Eakin, Michael Mangano, Joan Isern, Kenneth E. Sahr, Anna-Katerina Hadjantonakis, et Margaret H. Baron. « Tg(Afp-GFP) Expression Marks Primitive and Definitive Endoderm Lineages during Mouse Development ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 235, n° 9 (septembre 2006): 2549-58. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20843>.

- Laat, Wouter de, Petra Klous, Jurgen Kooren, Daan Noordermeer, Robert-Jan Palstra, Marieke Simonis, Erik Splinter, et Frank Grosveld. « Three-Dimensional Organization of Gene Expression in Erythroid Cells ». *Current Topics in Developmental Biology* 82 (2008): 117-39. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)00005-1).
- Landry, Josette-Renée, Dixie L. Mager, et Brian T. Wilhelm. « Complex Controls: The Role of Alternative Promoters in Mammalian Genomes ». *Trends in Genetics: TIG* 19, n° 11 (novembre 2003): 640-48. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.014>.
- Langmead, Ben, et Steven L. Salzberg. « Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2 ». *Nature Methods* 9, n° 4 (4 mars 2012): 357-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Laverrière, Jean-Noël, David L'Hôte, Laure Tabouy, Anne-Laure Schang, Bruno Quérat, et Joëlle Cohen-Tannoudji. « Epigenetic Regulation of Alternative Promoters and Enhancers in Progenitor, Immature, and Mature Gonadotrope Cell Lines ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 434 (15 octobre 2016): 250-65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.010>.
- Layman, L. C. « Mutations in the Follicle-Stimulating Hormone-Beta (FSH Beta) and FSH Receptor Genes in Mice and Humans ». *Seminars in Reproductive Medicine* 18, n° 1 (2000): 5-10. <https://doi.org/10.1055/s-2000-13470>.
- Le Tissier, P. R., D. J. Hodson, C. Lafont, P. Fontanaud, M. Schaeffer, et P. Mollard. « Anterior Pituitary Cell Networks ». *Frontiers in Neuroendocrinology* 33, n° 3 (août 2012): 252-66. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.08.002>.
- Lee, Hun-Goo, Tatyana G. Kahn, Amanda Simcox, Yuri B. Schwartz, et Vincenzo Pirrotta. « Genome-Wide Activities of Polycomb Complexes Control Pervasive Transcription ». *Genome Research* 25, n° 8 (août 2015): 1170-81. <https://doi.org/10.1101/gr.188920.114>.
- Lee, Ji-Eun, Young-Kwon Park, Sarah Park, Younghoon Jang, Nicholas Waring, Anup Dey, Keiko Ozato, Binbin Lai, Weiqun Peng, et Kai Ge. « Brd4 Binds to Active Enhancers to Control Cell Identity Gene Induction in Adipogenesis and Myogenesis ». *Nature Communications* 8, n° 1 (20 décembre 2017): 2217. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02403-5>.
- Lee, Ji-Eun, Chaochen Wang, Shiliyang Xu, Young-Wook Cho, Lifeng Wang, Xuesong Feng, Anne Baldrige, et al. « H3K4 Mono- and Di-Methyltransferase MLL4 Is Required for Enhancer Activation during Cell Differentiation ». *ELife* 2 (24 décembre 2013): e01503. <https://doi.org/10.7554/eLife.01503>.
- Lee, Sunju, Jinjoo Kang, Jaehyuk Yoo, Sathish K. Ganesan, Sarah C. Cook, Berenice Aguilar, Swapnika Ramu, Juneyong Lee, et Young-Kwon Hong. « Prox1 Physically and Functionally Interacts with COUP-TFII to Specify Lymphatic Endothelial Cell Fate ». *Blood* 113, n° 8 (19 février 2009): 1856-59. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-145789>.
- Lemon, B., et R. Tjian. « Orchestrated Response: A Symphony of Transcription Factors for Gene Control ». *Genes & Development* 14, n° 20 (15 octobre 2000): 2551-69. <https://doi.org/10.1101/gad.831000>.
- Lenhard, Boris, Albin Sandelin, et Piero Carninci. « Metazoan Promoters: Emerging Characteristics and Insights into Transcriptional Regulation ». *Nature Reviews Genetics* 13, n° 4 (avril 2012): 233-45. <https://doi.org/10.1038/nrg3163>.
- Lettice, Laura A., Simon J. H. Heaney, Lorna A. Purdie, Li Li, Philippe de Beer, Ben A. Oostra, Debbie Goode, Greg Elgar, Robert E. Hill, et Esther de Graaff. « A Long-Range Shh Enhancer Regulates Expression in the Developing Limb and Fin and Is Associated with Preaxial Polydactyly ». *Human Molecular Genetics* 12, n° 14 (15 juillet 2003): 1725-35. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg180>.
- Li, Peipei, Yuan Meng, Li Wang, et Li-Jun Di. « BioID: A Proximity-Dependent Labeling Approach in Proteomics Study ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1871 (2019): 143-51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8814-3_10.
- Li, Yong, Mihwa Choi, Greg Cavey, Jennifer Daugherty, Kelly Suino, Amanda Kovach, Nathan C. Bingham, Steven A. Kliewer, et H. Eric Xu. « Crystallographic Identification and Functional Characterization of Phospholipids as Ligands for the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor-1 ». *Molecular Cell* 17, n° 4 (18 février 2005): 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.002>.
- Li, Yuanyuan, et Trygve O. Tollefsbol. « DNA Methylation Detection: Bisulfite Genomic Sequencing Analysis ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 791 (2011): 11-21. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2.
- Lin, Chin-Yo, Vinsensius B. Vega, Jane S. Thomsen, Tao Zhang, Say Li Kong, Min Xie, Kuo Ping Chiu, et al. « Whole-Genome Cartography of Estrogen Receptor Alpha Binding Sites ». *PLoS Genetics* 3, n° 6 (juin 2007): e87. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030087>.

- Lin, L., et J. C. Achermann. « Steroidogenic Factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and Disorders of Testis Development ». *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation 2*, n° 4-5 (2008): 200-209. <https://doi.org/10.1159/000152036>.
- Liu, Feng. « Enhancer-Derived RNA: A Primer ». *Genomics, Proteomics & Bioinformatics 15*, n° 3 (juin 2017): 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.006>.
- Liu, Fengjiao, John Z. H. Zhang, et Ye Mei. « The Origin of the Cooperativity in the Streptavidin-Biotin System: A Computational Investigation through Molecular Dynamics Simulations ». *Scientific Reports 6* (1 juin 2016): 27190. <https://doi.org/10.1038/srep27190>.
- Liu, Fujun, Darrell A. Austin, et Nicholas J. G. Webster. « Gonadotropin-Releasing Hormone-Desensitized LbetaT2 Gonadotrope Cells Are Refractory to Acute Protein Kinase C, Cyclic AMP, and Calcium-Dependent Signaling ». *Endocrinology 144*, n° 10 (octobre 2003): 4354-65. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0204>.
- Liu, Yiwei, Yusuf Olatunde Olanrewaju, Yu Zheng, Hideharu Hashimoto, Robert M. Blumenthal, Xing Zhang, et Xiaodong Cheng. « Structural Basis for Klf4 Recognition of Methylated DNA ». *Nucleic Acids Research 42*, n° 8 (avril 2014): 4859-67. <https://doi.org/10.1093/nar/gku134>.
- Local, Andrea, Hui Huang, Claudio P. Albuquerque, Namit Singh, Ah Young Lee, Wei Wang, Chaochen Wang, et al. « Identification of H3K4me1-Associated Proteins at Mammalian Enhancers ». *Nature Genetics 50*, n° 1 (janvier 2018): 73-82. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0015-6>.
- Lofrano-Porto, Adriana, Gustavo Barcelos Barra, Leonardo Abdala Giacomini, Paula Pires Nascimento, Ana Claudia Latronico, Luiz Augusto Casulari, et Francisco de Assis da Rocha Neves. « Luteinizing Hormone Beta Mutation and Hypogonadism in Men and Women ». *The New England Journal of Medicine 357*, n° 9 (30 août 2007): 897-904. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071999>.
- Lohrer, P., J. Gloddek, A. C. Nagashima, Z. Koral, U. Hopfner, M. P. Pereda, E. Arzt, G. K. Stalla, et U. Renner. « Lipopolysaccharide Directly Stimulates the Intrapituitary Interleukin-6 Production by Folliculostellate Cells via Specific Receptors and the P38alpha Mitogen-Activated Protein Kinase/Nuclear Factor-KappaB Pathway ». *Endocrinology 141*, n° 12 (décembre 2000): 4457-65. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7811>.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, et T. J. Richmond. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature 389*, n° 6648 (18 septembre 1997): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Luo, X., Y. Ikeda, et K. L. Parker. « A Cell-Specific Nuclear Receptor Is Essential for Adrenal and Gonadal Development and Sexual Differentiation ». *Cell 77*, n° 4 (20 mai 1994): 481-90. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90211-9).
- Lupien, Mathieu, Jérôme Eeckhoute, Clifford A. Meyer, Qianben Wang, Yong Zhang, Wei Li, Jason S. Carroll, X. Shirley Liu, et Myles Brown. « FoxA1 Translates Epigenetic Signatures into Enhancer-Driven Lineage-Specific Transcription ». *Cell 132*, n° 6 (21 mars 2008): 958-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.018>.
- Maggi, Adriana, et Alessandro Villa. « In Vivo Dynamics of Estrogen Receptor Activity: The ERE-Luc Model ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 139* (janvier 2014): 262-69. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.007>.
- Majdic, G., R. M. Sharpe, et P. T. Saunders. « Maternal Oestrogen/Xenoestrogen Exposure Alters Expression of Steroidogenic Factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the Fetal Rat Testis ». *Molecular and Cellular Endocrinology 127*, n° 1 (14 mars 1997): 91-98. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(96\)03998-6](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(96)03998-6).
- Majdic, Gregor, Morag Young, Elise Gomez-Sanchez, Paul Anderson, Lidia S. Szczepaniak, Robert L. Dobbins, J. Denis McGarry, et Keith L. Parker. « Knockout Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 Are a Novel Genetic Model of Hypothalamic Obesity ». *Endocrinology 143*, n° 2 (février 2002): 607-14. <https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8652>.
- Malik, Shivani, et Sukesh R. Bhaumik. « Mixed Lineage Leukemia: Histone H3 Lysine 4 Methyltransferases from Yeast to Human ». *The FEBS Journal 277*, n° 8 (avril 2010): 1805-21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07607.x>.
- Malik, Sohail, et Robert G. Roeder. « Dynamic Regulation of Pol II Transcription by the Mammalian Mediator Complex ». *Trends in Biochemical Sciences 30*, n° 5 (mai 2005): 256-63. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.03.009>.
- Manavathi, Bramanandam, Venkata S. K. Samanthapudi, et Vijay Narasimha Reddy Gajulapalli. « Estrogen Receptor Coregulators and Pioneer Factors: The Orchestrators of Mammary Gland Cell Fate and Development ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology 2* (2014): 34. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00034>.

- Månsson, Robert, Anne Hultquist, Sidinh Luc, Liping Yang, Kristina Anderson, Shabnam Kharazi, Suleiman Al-Hashmi, et al. « Molecular Evidence for Hierarchical Transcriptional Lineage Priming in Fetal and Adult Stem Cells and Multipotent Progenitors ». *Immunity* 26, n° 4 (avril 2007): 407-19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.013>.
- Masserdotti, Giacomo, Sébastien Gillotin, Bernd Sutor, Daniela Drechsel, Martin Irmeler, Helle F. Jørgensen, Steffen Sass, et al. « Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes ». *Cell Stem Cell* 17, n° 1 (2 juillet 2015): 74-88. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.014>.
- Matsuda, Taito, Takashi Irie, Shutaro Katsurabayashi, Yoshinori Hayashi, Tatsuya Nagai, Nobuhiko Hamazaki, Aliya Mari D. Adefuin, et al. « Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion ». *Neuron* 101, n° 3 (6 février 2019): 472-485.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.010>.
- Mayran, Alexandre, Konstantin Khetchoumian, Fadi Hariri, Tomi Pastinen, Yves Gauthier, Aurelio Balsalobre, et Jacques Drouin. « Pioneer Factor Pax7 Deploys a Stable Enhancer Repertoire for Specification of Cell Fate ». *Nature Genetics* 50, n° 2 (février 2018): 259-69. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0035-2>.
- Mayran, Alexandre, Kevin Sochodolsky, Konstantin Khetchoumian, Juliette Harris, Yves Gauthier, Amandine Bemmo, Aurelio Balsalobre, et Jacques Drouin. « Pioneer and Nonpioneer Factor Cooperation Drives Lineage Specific Chromatin Opening ». *Nature Communications* 10, n° 1 (23 août 2019): 3807. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11791-9>.
- Mazzarella, Luca, Helle F. Jørgensen, Jorge Soza-Ried, Anna V. Terry, Stella Pearson, Georges Lacaud, Valerie Kouskoff, Matthias Merckenschlager, et Amanda G. Fisher. « Embryonic Stem Cell-Derived Hemangioblasts Remain Epigenetically Plastic and Require PRC1 to Prevent Neural Gene Expression ». *Blood* 117, n° 1 (6 janvier 2011): 83-87. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-273128>.
- McGillivray, Shauna M., Janice S. Bailey, Rosha Ramezani, Brian J. Kirkwood, et Pamela L. Mellon. « Mouse GnRH Receptor Gene Expression Is Mediated by the LHX3 Homeodomain Protein ». *Endocrinology* 146, n° 5 (mai 2005): 2180-85. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1566>.
- Meng, Yuan Guang, Wei Dong Han, Ya Li Zhao, Ke Huang, Yi Ling Si, Zhi Qiang Wu, et Yi Ming Mu. « Induction of the LRP16 Gene by Estrogen Promotes the Invasive Growth of Ishikawa Human Endometrial Cancer Cells through the Downregulation of E-Cadherin ». *Cell Research* 17, n° 10 (octobre 2007): 869-80. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.79>.
- Merchenthaler, I., M. D. Culler, P. Petrusz, B. Flerkó, et A. Negro-Vilar. « Immunocytochemical Localization of the Gonadotropin-Releasing Hormone-Associated Peptide Portion of the LHRH Precursor in the Hypothalamus and Extrahypothalamic Regions of the Rat Central Nervous System ». *Cell and Tissue Research* 255, n° 1 (janvier 1989): 5-14. <https://doi.org/10.1007/BF00229060>.
- Milne, Thomas A., Keji Zhao, et Jay L. Hess. « Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) for Analysis of Histone Modifications and Chromatin-Associated Proteins ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 538 (2009): 409-23. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-418-6_21.
- Mladenova V., Mladenov E., et Russev G. « Organization of Plasmid DNA into Nucleosome-Like Structures after Transfection in Eukaryotic Cells ». *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23:1, 1044-1047, doi:10.1080/13102818.2009.10817609.
- Mohrs, M., C. M. Blankespoor, Z. E. Wang, G. G. Loots, V. Afzal, H. Hadeiba, K. Shinkai, E. M. Rubin, et R. M. Locksley. « Deletion of a Coordinate Regulator of Type 2 Cytokine Expression in Mice ». *Nature Immunology* 2, n° 9 (septembre 2001): 842-47. <https://doi.org/10.1038/ni0901-842>.
- Morohashi, K., H. Tsuboi-Asai, S. Matsushita, M. Suda, M. Nakashima, H. Sasano, Y. Hatada, et al. « Structural and Functional Abnormalities in the Spleen of an MFTz-F1 Gene-Disrupted Mouse ». *Blood* 93, n° 5 (1 mars 1999): 1586-94.
- Mortaud, S., E. Donsez-Darcel, P. L. Roubertoux, et H. Degrelle. « Murine Steroid Sulfatase Gene Expression in the Brain during Postnatal Development and Adulthood ». *Neuroscience Letters* 215, n° 3 (13 septembre 1996): 145-48. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12944-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12944-x).
- Nady, Nataliya, Alexander Lemak, John R. Walker, George V. Avvakumov, Michael S. Kareta, Mayada Achour, Sheng Xue, et al. « Recognition of Multivalent Histone States Associated with Heterochromatin by UHRF1 Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 286, n° 27 (8 juillet 2011): 24300-311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234104>.
- Nagpal, Neha, Shivani Sharma, Sourobh Maji, Giorgio Durante, Manuela Ferracin, Jitendra K. Thakur, et Ritu Kulshreshtha. « Essential Role of MED1 in the Transcriptional Regulation of ER-Dependent

- Oncogenic MiRNAs in Breast Cancer ». *Scientific Reports* 8, n° 1 (7 août 2018): 11805. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29546-9>.
- Nassa, Giovanni, Giorgio Giurato, Annamaria Salvati, Valerio Gigantino, Giovanni Pecoraro, Jessica Lamberti, Francesca Rizzo, Tuula A. Nyman, Roberta Tarallo, et Alessandro Weisz. « The RNA-Mediated Estrogen Receptor α Interactome of Hormone-Dependent Human Breast Cancer Cell Nuclei ». *Scientific Data* 6, n° 1 (16 septembre 2019): 173. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0179-2>.
- Natoli, Gioacchino, et Jean-Christophe Andrau. « Noncoding Transcription at Enhancers: General Principles and Functional Models ». *Annual Review of Genetics* 46 (2012): 1-19. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155459>.
- Ninomiya, Y., M. Okada, N. Kotomura, K. Suzuki, T. Tsukiyama, et O. Niwa. « Genomic Organization and Isoforms of the Mouse ELP Gene ». *Journal of Biochemistry* 118, n° 2 (août 1995): 380-89. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124918>.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, et E. Li. « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development ». *Cell* 99, n° 3 (29 octobre 1999): 247-57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81656-6).
- Olsson, Andre, Meenakshi Venkatasubramanian, Viren K. Chaudhri, Bruce J. Aronow, Nathan Salomonis, Harinder Singh, et H. Leighton Grimes. « Single-Cell Analysis of Mixed-Lineage States Leading to a Binary Cell Fate Choice ». *Nature* 537, n° 7622 (29 septembre 2016): 698-702. <https://doi.org/10.1038/nature19348>.
- Ong, Shao-En, et Matthias Mann. « A Practical Recipe for Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) ». *Nature Protocols* 1, n° 6 (2006): 2650-60. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.427>.
- Ooi, Steen K. T., Chen Qiu, Emily Bernstein, Keqin Li, Da Jia, Zhe Yang, Hediye Erdjument-Bromage, et al. « DNMT3L Connects Unmethylated Lysine 4 of Histone H3 to de Novo Methylation of DNA ». *Nature* 448, n° 7154 (9 août 2007): 714-17. <https://doi.org/10.1038/nature05987>.
- Osumi-Yamashita, N., Y. Ninomiya, H. Doi, et K. Eto. « The Contribution of Both Forebrain and Midbrain Crest Cells to the Mesenchyme in the Frontonasal Mass of Mouse Embryos ». *Developmental Biology* 164, n° 2 (août 1994): 409-19. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1211>.
- Otani, Junji, Toshiyuki Nankumo, Kyohei Arita, Susumu Inamoto, Mariko Ariyoshi, et Masahiro Shirakawa. « Structural Basis for Recognition of H3K4 Methylation Status by the DNA Methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L Domain ». *EMBO Reports* 10, n° 11 (novembre 2009): 1235-41. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.218>.
- Oughtred, Rose, Jennifer Rust, Christie Chang, Bobby-Joe Breitkreutz, Chris Stark, Andrew Willems, Lorrie Boucher, et al. « The BioGRID Database: A Comprehensive Biomedical Resource of Curated Protein, Genetic, and Chemical Interactions ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 30, n° 1 (janvier 2021): 187-200. <https://doi.org/10.1002/pro.3978>.
- Ozone, Chikafumi, Hidetaka Suga, Mototsugu Eiraku, Taisuke Kadoshima, Shigenobu Yonemura, Nozomu Takata, Yutaka Oiso, Takashi Tsuji, et Yoshiki Sasai. « Functional Anterior Pituitary Generated in Self-Organizing Culture of Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Communications* 7, n° 1 (14 janvier 2016): 10351. <https://doi.org/10.1038/ncomms10351>.
- Pabo, C. O., et R. T. Sauer. « Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition ». *Annual Review of Biochemistry* 61 (1992): 1053-95. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.005201>.
- Pacini, Vincent, Florence Petit, Bruno Quérat, Jean-Noël Laverrière, Joëlle Cohen-Tannoudji, et David L'hôte. « ER α orchestre les mécanismes épigénétiques qui déclenchent l'expression du gène Sf-1 au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire ». *médecine/sciences* 36, n° 6-7 (1 juin 2020): 562-65. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020103>.
- Pacini, Vincent, Florence Petit, Bruno Querat, Jean-Noël Laverrière, Joëlle Cohen-Tannoudji, et David L'hôte. « Identification of a Pituitary ER α -Activated Enhancer Triggering the Expression of Nr5a1, the Earliest Gonadotrope Lineage-Specific Transcription Factor ». *Epigenetics & Chromatin* 12, n° 1 (7 août 2019): 48. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0291-8>.
- Palaniappan, Murugesan, Loc Nguyen, Sandra L. Grimm, Yuanxin Xi, Zheng Xia, Wei Li, et Cristian Coarfa. « The Genomic Landscape of Estrogen Receptor α Binding Sites in Mouse Mammary Gland ». *PLoS One* 14, n° 8 (2019): e0220311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220311>.
- Parker, K. L., et B. P. Schimmer. « Steroidogenic Factor 1: A Key Determinant of Endocrine Development and Function ». *Endocrine Reviews* 18, n° 3 (juin 1997): 361-77. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0301>.

- Pasini, Diego, Klaus H. Hansen, Jesper Christensen, Karl Agger, Paul A. C. Cloos, et Kristian Helin. « Coordinated Regulation of Transcriptional Repression by the RBP2 H3K4 Demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2 ». *Genes & Development* 22, n° 10 (15 mai 2008): 1345-55. <https://doi.org/10.1101/gad.470008>.
- Pelusi, Carla, Yayoi Ikeda, Mohamad Zubair, et Keith L. Parker. « Impaired Follicle Development and Infertility in Female Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 in Ovarian Granulosa Cells ». *Biology of Reproduction* 79, n° 6 (décembre 2008): 1074-83. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069435>.
- Pennacchio, Len A., Wendy Bickmore, Ann Dean, Marcelo A. Nobrega, et Gill Bejerano. « Enhancers: Five Essential Questions ». *Nature Reviews. Genetics* 14, n° 4 (avril 2013): 288-95. <https://doi.org/10.1038/nrg3458>.
- Pernasetti, F., V. V. Vasilyev, S. B. Rosenberg, J. S. Bailey, H. J. Huang, W. L. Miller, et P. L. Mellon. « Cell-Specific Transcriptional Regulation of Follicle-Stimulating Hormone-Beta by Activin and Gonadotropin-Releasing Hormone in the LbetaT2 Pituitary Gonadotrope Cell Model ». *Endocrinology* 142, n° 6 (juin 2001): 2284-95. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8185>.
- Pfaff, S. L., M. Mendelsohn, C. L. Stewart, T. Edlund, et T. M. Jessell. « Requirement for LIM Homeobox Gene Isl1 in Motor Neuron Generation Reveals a Motor Neuron-Dependent Step in Interneuron Differentiation ». *Cell* 84, n° 2 (26 janvier 1996): 309-20. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80985-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80985-x).
- Pincas, H., K. Amoyel, R. Counis, et J. N. Laverrière. « Proximal Cis-Acting Elements, Including Steroidogenic Factor 1, Mediate the Efficiency of a Distal Enhancer in the Promoter of the Rat Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15, n° 2 (février 2001): 319-37. <https://doi.org/10.1210/mend.15.2.0593>.
- Pogoda, Hans-Martin, et Matthias Hammerschmidt. « Molecular Genetics of Pituitary Development in Zebrafish ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18, n° 4 (août 2007): 543-58. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.04.004>.
- Pointis, G., M. T. Latreille, T. M. Mignot, Y. Janssens, et L. Cedard. « Regulation of Testosterone Synthesis in the Fetal Mouse Testis ». *Journal of Steroid Biochemistry* 11, n° 5-6 (décembre 1979): 1609-12. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90357-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90357-1).
- Ptashne, M., et A. Gann. « Transcriptional Activation by Recruitment ». *Nature* 386, n° 6625 (10 avril 1997): 569-77. <https://doi.org/10.1038/386569a0>.
- Pulichino, Anne-Marie, Sophie Vallette-Kasic, Judy Peih-Ying Tsai, Catherine Couture, Yves Gauthier, et Jacques Drouin. « Tpit Determines Alternate Fates during Pituitary Cell Differentiation ». *Genes & Development* 17, n° 6 (15 mars 2003): 738-47. <https://doi.org/10.1101/gad.1065703>.
- Rada-Iglesias, Alvaro, Ruchi Bajpai, Tomek Swigut, Samantha A. Brugmann, Ryan A. Flynn, et Joanna Wysocka. « A Unique Chromatin Signature Uncovers Early Developmental Enhancers in Humans ». *Nature* 470, n° 7333 (10 février 2011): 279-83. <https://doi.org/10.1038/nature09692>.
- Raut, Sanketa, Anita V. Kumar, Kushaan Khambata, Sharvari Deshpande, et Nafisa H. Balasiner. « Genome-Wide Identification of Estrogen Receptor Binding Sites Reveals Novel Estrogen-Responsive Pathways in Adult Male Germ Cells ». *The Biochemical Journal* 477, n° 12 (26 juin 2020): 2115-31. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190946>.
- Ren, Xiaodi, Rachael Siegel, Unkyu Kim, et Robert G. Roeder. « Direct Interactions of OCA-B and TFII-I Regulate Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Transcription by Facilitating Enhancer-Promoter Communication ». *Molecular Cell* 42, n° 3 (6 mai 2011): 342-55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.011>.
- Rhee, Ho Sung, Michael Closser, Yuchun Guo, Elizaveta V. Bashkirova, G. Christopher Tan, David K. Gifford, et Hynek Wichterle. « Expression of Terminal Effector Genes in Mammalian Neurons Is Maintained by a Dynamic Relay of Transient Enhancers ». *Neuron* 92, n° 6 (21 décembre 2016): 1252-65. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.037>.
- Riggs, A. D. « X Inactivation, Differentiation, and DNA Methylation ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 14, n° 1 (1975): 9-25. <https://doi.org/10.1159/000130315>.
- Rizzoti, Karine, et Robin Lovell-Badge. « Early Development of the Pituitary Gland: Induction and Shaping of Rathke's Pouch ». *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 6, n° 3 (août 2005): 161-72. <https://doi.org/10.1007/s11154-005-3047-7>.
- Roadmap Epigenomics Consortium, Anshul Kundaje, Wouter Meuleman, Jason Ernst, Misha Bilenky, Angela Yen, Alireza Heravi-Moussavi, et al. « Integrative Analysis of 111 Reference Human Epigenomes ». *Nature* 518, n° 7539 (19 février 2015): 317-30. <https://doi.org/10.1038/nature14248>.
- Robert, Marie-France, Steves Morin, Normand Beaulieu, France Gauthier, Ian C. Chute, Annie Barsalou, et A. Robert MacLeod. « DNMT1 Is Required to Maintain CpG Methylation and Aberrant

- Gene Silencing in Human Cancer Cells ». *Nature Genetics* 33, n° 1 (janvier 2003): 61-65. <https://doi.org/10.1038/ng1068>.
- Robinson, Philip J., Michael J. Trnka, Riccardo Pellarin, Charles H. Greenberg, David A. Bushnell, Ralph Davis, Alma L. Burlingame, Andrej Sali, et Roger D. Kornberg. « Molecular Architecture of the Yeast Mediator Complex ». *ELife* 4 (24 septembre 2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.08719>.
- Rosenfeld, M. G., P. Briata, J. Dasen, A. S. Gleiberman, C. Kioussi, C. Lin, S. M. O'Connell, A. Ryan, D. P. Szeto, et M. Treier. « Multistep Signaling and Transcriptional Requirements for Pituitary Organogenesis in Vivo ». *Recent Progress in Hormone Research* 55 (2000): 1-13; discussion 13-14.
- Ross-Innes, Caryn S., Rory Stark, Kelly A. Holmes, Dominic Schmidt, Christiana Spyrou, Roslin Russell, Charlie E. Massie, Sarah L. Vowler, Matthew Eldridge, et Jason S. Carroll. « Cooperative Interaction between Retinoic Acid Receptor-Alpha and Estrogen Receptor in Breast Cancer ». *Genes & Development* 24, n° 2 (15 janvier 2010): 171-82. <https://doi.org/10.1101/gad.552910>.
- Rothbart, Scott B., et Brian D. Strahl. « Interpreting the Language of Histone and DNA Modifications ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1839, n° 8 (août 2014): 627-43. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>.
- Rougeulle, Claire, Julie Chaumeil, Kavitha Sarma, C. David Allis, Danny Reinberg, Philip Avner, et Edith Heard. « Differential Histone H3 Lys-9 and Lys-27 Methylation Profiles on the X Chromosome ». *Molecular and Cellular Biology* 24, n° 12 (juin 2004): 5475-84. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5475-5484.2004>.
- Rubenstein, J. L., K. Shimamura, S. Martinez, et L. Puelles. « Regionalization of the Prosencephalic Neural Plate ». *Annual Review of Neuroscience* 21 (1998): 445-77. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.445>.
- Rush, Margaret, Ruth Appanah, Sandra Lee, Lucia L. Lam, Preeti Goyal, et Matthew C. Lorincz. « Targeting of EZH2 to a Defined Genomic Site Is Sufficient for Recruitment of Dnmt3a but Not de Novo DNA Methylation ». *Epigenetics* 4, n° 6 (16 août 2009): 404-14. <https://doi.org/10.4161/epi.4.6.9392>.
- Russell, John P., Xinhong Lim, Alice Santambrogio, Val Yianni, Yasmine Kemkem, Bruce Wang, Matthew Fish, et al. « Pituitary Stem Cells Produce Paracrine WNT Signals to Control the Expansion of Their Descendant Progenitor Cells ». *ELife* 10 (5 janvier 2021). <https://doi.org/10.7554/eLife.59142>.
- Russell, John P., Emily J. Lodge, et Cynthia L. Andoniadou. « Basic Research Advances on Pituitary Stem Cell Function and Regulation ». *Neuroendocrinology* 107, n° 2 (2018): 196-203. <https://doi.org/10.1159/000488393>.
- Sablin, Elena P., Raymond D. Blind, Irina N. Krylova, Jared G. Ingraham, Fang Cai, Jon D. Williams, Robert J. Fletterick, et Holly A. Ingraham. « Structure of SF-1 Bound by Different Phospholipids: Evidence for Regulatory Ligands ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 23, n° 1 (janvier 2009): 25-34. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0508>.
- Sadovsky, Y., P. A. Crawford, K. G. Woodson, J. A. Polish, M. A. Clements, L. M. Tourtellotte, K. Simburger, et J. Milbrandt. « Mice Deficient in the Orphan Receptor Steroidogenic Factor 1 Lack Adrenal Glands and Gonads but Express P450 Side-Chain-Cleavage Enzyme in the Placenta and Have Normal Embryonic Serum Levels of Corticosteroids ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, n° 24 (21 novembre 1995): 10939-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.10939>.
- Safe, Stephen, Kyoungyun Kim, et Kyoungkim Kim. « Non-Classical Genomic Estrogen Receptor (ER)/Specificity Protein and ER/Activating Protein-1 Signaling Pathways ». *Journal of Molecular Endocrinology* 41, n° 5 (novembre 2008): 263-75. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0103>.
- Sagai, Tomoko, Masaki Hosoya, Youichi Mizushima, Masaru Tamura, et Toshihiko Shiroishi. « Elimination of a Long-Range Cis-Regulatory Module Causes Complete Loss of Limb-Specific Shh Expression and Truncation of the Mouse Limb ». *Development (Cambridge, England)* 132, n° 4 (février 2005): 797-803. <https://doi.org/10.1242/dev.01613>.
- Sainsbury, Sarah, Carrie Bernecky, et Patrick Cramer. « Structural Basis of Transcription Initiation by RNA Polymerase II ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16, n° 3 (mars 2015): 129-43. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>.
- Sánchez-Criado, José E., Kourtney Trudgen, Yolanda Millán, Alfonso Blanco, José Monterde, José C. Garrido-Gracia, Ana Gordon, Rafaela Aguilar, Juana Martín de Las Mulas, et CheMyong Ko. « Estrogen Receptor (ESR) 2 Partially Offsets the Absence of ESR1 in Gonadotropes of Pituitary-Specific Esr1 Knockout Female Mice ». *Reproduction (Cambridge, England)* 143, n° 4 (avril 2012): 549-58. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0214>.

- Sardina, Jose Luis, Samuel Collombet, Tian V. Tian, Antonio Gómez, Bruno Di Stefano, Clara Berenguer, Justin Brumbaugh, et al. « Transcription Factors Drive Tet2-Mediated Enhancer Demethylation to Reprogram Cell Fate ». *Cell Stem Cell* 23, n° 5 (1 novembre 2018): 727-741.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.016>.
- Schang, Anne-Laure, Christian Bleux, Marie-Claude Chenut, Valérie Ngô-Muller, Bruno Quérat, Jean-Claude Jeanny, Raymond Counis, Joëlle Cohen-Tannoudji, et Jean-Noël Laverrière. « Identification and Analysis of Two Novel Sites of Rat GnRH Receptor Gene Promoter Activity: The Pineal Gland and Retina ». *Neuroendocrinology* 97, n° 2 (2013): 115-31. <https://doi.org/10.1159/000337661>.
- Schang, Anne-Laure, Anne Granger, Bruno Quérat, Christian Bleux, Joëlle Cohen-Tannoudji, et Jean-Noël Laverrière. « GATA2-Induced Silencing and LIM-Homeodomain Protein-Induced Activation Are Mediated by a Bi-Functional Response Element in the Rat GnRH Receptor Gene ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27, n° 1 (janvier 2013): 74-91. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1182>.
- Schang, Anne-Laure, Valérie Ngô-Muller, Christian Bleux, Anne Granger, Marie-Claude Chenut, Catherine Loudes, Solange Magre, Raymond Counis, Joëlle Cohen-Tannoudji, et Jean-Noël Laverrière. « GnRH Receptor Gene Expression in the Developing Rat Hippocampus: Transcriptional Regulation and Potential Roles in Neuronal Plasticity ». *Endocrinology* 152, n° 2 (février 2011): 568-80. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0840>.
- Schang, Anne-Laure, Bruno Quérat, Violaine Simon, Ghislaine Garrel, Christian Bleux, Raymond Counis, Joëlle Cohen-Tannoudji, et Jean-Noël Laverrière. « Mechanisms Underlying the Tissue-Specific and Regulated Activity of the GnRH Promoter in Mammals ». *Frontiers in Endocrinology* 3 (2012): 162. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00162>.
- Schimmer, Bernard P., et Perrin C. White. « Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 24, n° 7 (juillet 2010): 1322-37. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0519>.
- Schlosser, Gerhard. « Induction and Specification of Cranial Placodes ». *Developmental Biology* 294, n° 2 (15 juin 2006): 303-51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.009>.
- Scully, Kathleen M., et Michael G. Rosenfeld. « Pituitary Development: Regulatory Codes in Mammalian Organogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 295, n° 5563 (22 mars 2002): 2231-35. <https://doi.org/10.1126/science.1062736>.
- Sekiya, Takashi, Uma M. Muthurajan, Karolin Luger, Alexei V. Tulin, et Kenneth S. Zaret. « Nucleosome-Binding Affinity as a Primary Determinant of the Nuclear Mobility of the Pioneer Transcription Factor FoxA ». *Genes & Development* 23, n° 7 (1 avril 2009): 804-9. <https://doi.org/10.1101/gad.1775509>.
- Selth, Luke A., Stefan Sigurdsson, et Jesper Q. Svejstrup. « Transcript Elongation by RNA Polymerase II ». *Annual Review of Biochemistry* 79 (2010): 271-93. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425>.
- Sheng, H. Z., et H. Westphal. « Early Steps in Pituitary Organogenesis ». *Trends in Genetics: TIG* 15, n° 6 (juin 1999): 236-40. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01742-4](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01742-4).
- Shima, Yuichi, Kanako Miyabayashi, Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Yukako Katsura, Sanae Oka, Mohamad Zubair, et Ken-ichirou Morohashi. « Identification of an Enhancer in the Ad4BP/SF-1 Gene Specific for Fetal Leydig Cells ». *Endocrinology* 153, n° 1 (janvier 2012): 417-25. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1407>.
- Shima, Yuichi, Kanako Miyabayashi, Tetsuya Sato, Mikita Suyama, Yasuyuki Ohkawa, Masao Doi, Hitoshi Okamura, et Kentaro Suzuki. « Fetal Leydig Cells Dedifferentiate and Serve as Adult Leydig Stem Cells ». *Development (Cambridge, England)* 145, n° 23 (5 décembre 2018). <https://doi.org/10.1242/dev.169136>.
- Shima, Yuichi, Mohamad Zubair, Satoru Ishihara, Yuko Shinohara, Sanae Oka, Shioko Kimura, Shiki Okamoto, Yasuhiko Minokoshi, Sachiyo Suita, et Ken-ichirou Morohashi. « Ventromedial Hypothalamic Nucleus-Specific Enhancer of Ad4BP/SF-1 Gene ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19, n° 11 (novembre 2005): 2812-23. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0431>.
- Shima, Yuichi, Mohamad Zubair, Tomoko Komatsu, Sanae Oka, Chikako Yokoyama, Taro Tachibana, Tord A. Hjalt, Jacques Drouin, et Ken-ichirou Morohashi. « Pituitary Homeobox 2 Regulates Adrenol4 Binding Protein/Steroidogenic Factor-1 Gene Transcription in the Pituitary Gonadotrope through Interaction with the Intronic Enhancer ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22, n° 7 (juillet 2008): 1633-46. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0444>.
- Shinoda, K., H. Lei, H. Yoshii, M. Nomura, M. Nagano, H. Shiba, H. Sasaki, Y. Osawa, Y. Ninomiya, et O. Niwa. « Developmental Defects of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus and Pituitary Gonadotroph in the Ftz-F1 Disrupted Mice ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the*

- American Association of Anatomists* 204, n° 1 (septembre 1995): 22-29. <https://doi.org/10.1002/aja.1002040104>.
- Simmons, D. M., J. W. Voss, H. A. Ingraham, J. M. Holloway, R. S. Broide, M. G. Rosenfeld, et L. W. Swanson. « Pituitary Cell Phenotypes Involve Cell-Specific Pit-1 MRNA Translation and Synergistic Interactions with Other Classes of Transcription Factors ». *Genes & Development* 4, n° 5 (mai 1990): 695-711. <https://doi.org/10.1101/gad.4.5.695>.
- Smale, Stephen T., et James T. Kadonaga. « The RNA Polymerase II Core Promoter ». *Annual Review of Biochemistry* 72 (2003): 449-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520>.
- Smemo, Scott, Luciene C. Campos, Ivan P. Moskowitz, José E. Krieger, Alexandre C. Pereira, et Marcelo A. Nobrega. « Regulatory Variation in a TBX5 Enhancer Leads to Isolated Congenital Heart Disease ». *Human Molecular Genetics* 21, n° 14 (15 juillet 2012): 3255-63. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds165>.
- Smith, P. F., L. S. Frawley, et J. D. Neill. « Detection of LH Release from Individual Pituitary Cells by the Reverse Hemolytic Plaque Assay: Estrogen Increases the Fraction of Gonadotropes Responding to GnRH ». *Endocrinology* 115, n° 6 (décembre 1984): 2484-86. <https://doi.org/10.1210/endo-115-6-2484>.
- Smith, V. M., P. P. Lee, S. Szychowski, et A. Winoto. « GATA-3 Dominant Negative Mutant. Functional Redundancy of the T Cell Receptor Alpha and Beta Enhancers ». *The Journal of Biological Chemistry* 270, n° 4 (27 janvier 1995): 1515-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1515>.
- Song, Sang-Hyun, Chunhui Hou, et Ann Dean. « A Positive Role for NLI/Ldb1 in Long-Range Beta-Globin Locus Control Region Function ». *Molecular Cell* 28, n° 5 (14 décembre 2007): 810-22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.025>.
- Soufi, Abdenour, Greg Donahue, et Kenneth S. Zaret. « Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome ». *Cell* 151, n° 5 (21 novembre 2012): 994-1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.045>.
- Soufi, Abdenour, Meilin Fernandez Garcia, Artur Jaroszewicz, Nebiyu Osman, Matteo Pellegrini, et Kenneth S. Zaret. « Pioneer Transcription Factors Target Partial DNA Motifs on Nucleosomes to Initiate Reprogramming ». *Cell* 161, n° 3 (23 avril 2015): 555-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.017>.
- Stallings, Nancy R., Neil A. Hanley, Gregor Majdic, Liping Zhao, Marit Bakke, et Keith L. Parker. « Development of a Transgenic Green Fluorescent Protein Lineage Marker for Steroidogenic Factor 1 ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 16, n° 10 (octobre 2002): 2360-70. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0003>.
- Stender, Joshua D., Kyuri Kim, Tze Howe Charn, Barry Komm, Ken C. N. Chang, W. Lee Kraus, Christopher Benner, Christopher K. Glass, et Benita S. Katzenellenbogen. « Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor Alpha DNA Binding and Tethering Mechanisms Identifies Runx1 as a Novel Tethering Factor in Receptor-Mediated Transcriptional Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 30, n° 16 (août 2010): 3943-55. <https://doi.org/10.1128/MCB.00118-10>.
- Stock, Julie K., Sara Giadrossi, Miguel Casanova, Emily Brookes, Miguel Vidal, Haruhiko Koseki, Neil Brockdorff, Amanda G. Fisher, et Ana Pombo. « Ring1-Mediated Ubiquitination of H2A Restrains Poised RNA Polymerase II at Bivalent Genes in Mouse ES Cells ». *Nature Cell Biology* 9, n° 12 (décembre 2007): 1428-35. <https://doi.org/10.1038/ncb1663>.
- Stojilkovic, S. S., J. Reinhart, et K. J. Catt. « Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors: Structure and Signal Transduction Pathways ». *Endocrine Reviews* 15, n° 4 (août 1994): 462-99. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-4-462>.
- Suga, Hidetaka, Taisuke Kadoshima, Maki Minaguchi, Masatoshi Ohgushi, Mika Soen, Tokushige Nakano, Nozomu Takata, et al. « Self-Formation of Functional Adenohypophysis in Three-Dimensional Culture ». *Nature* 480, n° 7375 (décembre 2011): 57-62. <https://doi.org/10.1038/nature10637>.
- Sun, Guoqiang, Ruth T. Yu, Ronald M. Evans, et Yanhong Shi. « Orphan Nuclear Receptor TLX Recruits Histone Deacetylases to Repress Transcription and Regulate Neural Stem Cell Proliferation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 39 (25 septembre 2007): 15282-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704089104>.
- Szutorisz, Henrietta, Niall Dillon, et László Tora. « The Role of Enhancers as Centres for General Transcription Factor Recruitment ». *Trends in Biochemical Sciences* 30, n° 11 (novembre 2005): 593-99. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.08.006>.
- Takaku, Motoki, Sara A. Grimm, Bony De Kumar, Brian D. Bennett, et Paul A. Wade. « Cancer-Specific Mutation of GATA3 Disrupts the Transcriptional Regulatory Network Governed by Estrogen Receptor

- Alpha, FOXA1 and GATA3 ». *Nucleic Acids Research* 48, n° 9 (21 mai 2020): 4756-68. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa179>.
- Takaku, Motoki, Sara A. Grimm, Takashi Shimbo, Lalith Perera, Roberta Menafra, Hendrik G. Stunnenberg, Trevor K. Archer, Shinichi Machida, Hitoshi Kurumizaka, et Paul A. Wade. « GATA3-Dependent Cellular Reprogramming Requires Activation-Domain Dependent Recruitment of a Chromatin Remodeler ». *Genome Biology* 17 (27 février 2016): 36. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0897-0>.
- Takasawa, Kei, Kenichi Kashimada, Emanuele Pelosi, Masatoshi Takagi, Tomohiro Morio, Hiroshi Asahara, David Schlessinger, Shuki Mizutani, et Peter Koopman. « FOXL2 Transcriptionally Represses Sf1 Expression by Antagonizing WT1 during Ovarian Development in Mice ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28, n° 5 (mai 2014): 2020-28. <https://doi.org/10.1096/fj.13-246108>.
- Takeda, Yukimasa, et Anton M. Jetten. « Prospero-Related Homeobox 1 (Prox1) Functions as a Novel Modulator of Retinoic Acid-Related Orphan Receptors α - and γ -Mediated Transactivation ». *Nucleic Acids Research* 41, n° 14 (août 2013): 6992-7008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt447>.
- Taketo, M., K. L. Parker, T. A. Howard, T. Tsukiyama, M. Wong, O. Niwa, C. C. Morton, P. M. Miron, et M. F. Seldin. « Homologs of Drosophila Fushi-Tarazu Factor 1 Map to Mouse Chromosome 2 and Human Chromosome 9q33 ». *Genomics* 25, n° 2 (20 janvier 1995): 565-67. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80059-u](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80059-u).
- Tanaka, Hiroki, Yoshimasa Takizawa, Motoki Takaku, Daiki Kato, Yusuke Kumagawa, Sara A. Grimm, Paul A. Wade, et Hitoshi Kurumizaka. « Interaction of the Pioneer Transcription Factor GATA3 with Nucleosomes ». *Nature Communications* 11, n° 1 (18 août 2020): 4136. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17959-y>.
- Teerds, Katja J., et Ilpo T. Huhtaniemi. « Morphological and Functional Maturation of Leydig Cells: From Rodent Models to Primates ». *Human Reproduction Update* 21, n° 3 (juin 2015): 310-28. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv008>.
- Rasmussen, A T. « the morphology of pars intermedia of the human hypophysis ». *Endocrinology* Volume 12, Issue 2, 1 March 1928, Pages 129–150, <https://doi.org/10.1210/endo-12-2-129>
- Thorvaldsdóttir, Helga, James T. Robinson, et Jill P. Mesirov. « Integrative Genomics Viewer (IGV): High-Performance Genomics Data Visualization and Exploration ». *Briefings in Bioinformatics* 14, n° 2 (mars 2013): 178-92. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.
- Toledo-Ortiz, Gabriela, Enamul Huq, et Peter H. Quail. « The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family ». *The Plant Cell* 15, n° 8 (août 2003): 1749-70. <https://doi.org/10.1105/tpc.013839>.
- Tran, Stella, Xiang Zhou, Christine Lafleur, Michael J. Calderon, Buffy S. Ellsworth, Sarah Kimmins, Ulrich Boehm, Mathias Treier, Derek Boerboom, et Daniel J. Bernard. « Impaired Fertility and FSH Synthesis in Gonadotrope-Specific Foxl2 Knockout Mice ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27, n° 3 (mars 2013): 407-21. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1286>.
- Treier, M., A. S. Gleiberman, S. M. O'Connell, D. P. Szeto, J. A. McMahon, A. P. McMahon, et M. G. Rosenfeld. « Multistep Signaling Requirements for Pituitary Organogenesis in Vivo ». *Genes & Development* 12, n° 11 (1 juin 1998): 1691-1704. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1691>.
- Treier, M., S. O'Connell, A. Gleiberman, J. Price, D. P. Szeto, R. Burgess, P. T. Chuang, A. P. McMahon, et M. G. Rosenfeld. « Hedgehog Signaling Is Required for Pituitary Gland Development ». *Development (Cambridge, England)* 128, n° 3 (février 2001): 377-86.
- Tremethick, David J. « Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30 Nm Fiber ». *Cell* 128, n° 4 (23 février 2007): 651-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.008>.
- Tsompana, Maria, et Michael J. Buck. « Chromatin Accessibility: A Window into the Genome ». *Epigenetics & Chromatin* 7, n° 1 (2014): 33. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-33>.
- Tsuritani, Katsuki, Takuma Irie, Riu Yamashita, Yuta Sakakibara, Hiroyuki Wakaguri, Akinori Kanai, Junko Mizushima-Sugano, Sumio Sugano, Kenta Nakai, et Yutaka Suzuki. « Distinct Class of Putative "Non-Conserved" Promoters in Humans: Comparative Studies of Alternative Promoters of Human and Mouse Genes ». *Genome Research* 17, n° 7 (juillet 2007): 1005-14. <https://doi.org/10.1101/gr.6030107>.
- Vakoc, Christopher R., Danielle L. Letting, Nele Gheldof, Tomoyuki Sawado, M. A. Bender, Mark Groudine, Mitchell J. Weiss, Job Dekker, et Gerd A. Blobel. « Proximity among Distant Regulatory Elements at the Beta-Globin Locus Requires GATA-1 and FOG-1 ». *Molecular Cell* 17, n° 3 (4 février 2005): 453-62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.028>.

- Viré, Emmanuelle, Carmen Brenner, Rachel Deplus, Loïc Blanchon, Mario Fraga, Céline Didelot, Lluís Morey, et al. « The Polycomb Group Protein EZH2 Directly Controls DNA Methylation ». *Nature* 439, n° 7078 (16 février 2006): 871-74. <https://doi.org/10.1038/nature04431>.
- Voigt, Philipp, Wee-Wei Tee, et Danny Reinberg. « A Double Take on Bivalent Promoters ». *Genes & Development* 27, n° 12 (15 juin 2013): 1318-38. <https://doi.org/10.1101/gad.219626>.113.
- Wang, Chaochen, Ji-Eun Lee, Binbin Lai, Todd S. Macfarlan, Shiliyang Xu, Lenan Zhuang, Chengyu Liu, Weiqun Peng, et Kai Ge. « Enhancer Priming by H3K4 Methyltransferase MLL4 Controls Cell Fate Transition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, n° 42 (18 octobre 2016): 11871-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606857113>.
- Wang, Feng, Christopher B. Marshall, et Mitsuhiro Ikura. « Transcriptional/Epigenetic Regulator CBP/P300 in Tumorigenesis: Structural and Functional Versatility in Target Recognition ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70, n° 21 (novembre 2013): 3989-4008. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1254-4>.
- Wang, Lu, Patrick A. Ozark, Edwin R. Smith, Zibo Zhao, Stacy A. Marshall, Emily J. Rendleman, Andrea Piunti, et al. « TET2 Coactivates Gene Expression through Demethylation of Enhancers ». *Science Advances* 4, n° 11 (novembre 2018): eaau6986. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6986>.
- Wang, Zhibin, Chongzhi Zang, Jeffrey A. Rosenfeld, Dustin E. Schones, Artem Barski, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, et al. « Combinatorial Patterns of Histone Acetylations and Methylations in the Human Genome ». *Nature Genetics* 40, n° 7 (juillet 2008): 897-903. <https://doi.org/10.1038/ng.154>.
- Watt, F., et P. L. Molloy. « Cytosine Methylation Prevents Binding to DNA of a HeLa Cell Transcription Factor Required for Optimal Expression of the Adenovirus Major Late Promoter ». *Genes & Development* 2, n° 9 (septembre 1988): 1136-43. <https://doi.org/10.1101/gad.2.9.1136>.
- Weedon, Michael N., Ines Cebola, Ann-Marie Patch, Sarah E. Flanagan, Elisa De Franco, Richard Caswell, Santiago A. Rodríguez-Seguí, et al. « Recessive Mutations in a Distal PTF1A Enhancer Cause Isolated Pancreatic Agenesis ». *Nature Genetics* 46, n° 1 (janvier 2014): 61-64. <https://doi.org/10.1038/ng.2826>.
- Weirauch, Matthew T., Ally Yang, Mihai Albu, Atina G. Cote, Alejandro Montenegro-Montero, Philipp Drewe, Hamed S. Najafabadi, et al. « Determination and Inference of Eukaryotic Transcription Factor Sequence Specificity ». *Cell* 158, n° 6 (11 septembre 2014): 1431-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.009>.
- Weiss, J., K. A. Duca, et W. F. Crowley. « Gonadotropin-Releasing Hormone-Induced Stimulation and Desensitization of Free Alpha-Subunit Secretion Mirrors Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Perfused Rat Pituitary Cells ». *Endocrinology* 127, n° 5 (novembre 1990): 2364-71. <https://doi.org/10.1210/endo-127-5-2364>.
- Whyte, Warren A., Steve Bilodeau, David A. Orlando, Heather A. Hoke, Garrett M. Frampton, Charles T. Foster, Shaun M. Cowley, et Richard A. Young. « Enhancer Decommissioning by LSD1 during Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Nature* 482, n° 7384 (1 février 2012): 221-25. <https://doi.org/10.1038/nature10805>.
- Wilhelm, Dagmar, et Christoph Englert. « The Wilms Tumor Suppressor WT1 Regulates Early Gonad Development by Activation of Sf1 ». *Genes & Development* 16, n° 14 (15 juillet 2002): 1839-51. <https://doi.org/10.1101/gad.220102>.
- Windle, J. J., R. I. Weiner, et P. L. Mellon. « Cell Lines of the Pituitary Gonadotrope Lineage Derived by Targeted Oncogenesis in Transgenic Mice ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 4, n° 4 (avril 1990): 597-603. <https://doi.org/10.1210/mend-4-4-597>.
- Wit, Elzo de, et Wouter de Laat. « A Decade of 3C Technologies: Insights into Nuclear Organization ». *Genes & Development* 26, n° 1 (1 janvier 2012): 11-24. <https://doi.org/10.1101/gad.179804>.111.
- Wood, Michelle A., et Gary D. Hammer. « Adrenocortical Stem and Progenitor Cells: Unifying Model of Two Proposed Origins ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 336, n° 1-2 (10 avril 2011): 206-12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.012>.
- Wray, S., A. Nieburgs, et S. Elkabes. « Spatiotemporal Cell Expression of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in the Prenatal Mouse: Evidence for an Embryonic Origin in the Olfactory Placode ». *Brain Research. Developmental Brain Research* 46, n° 2 (1 avril 1989): 309-18. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(89\)90295-2](https://doi.org/10.1016/0165-3806(89)90295-2).
- Wu, Hao, et Yi Zhang. « Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions ». *Cell* 156, n° 1-2 (16 janvier 2014): 45-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>.
- Xie, Huimin, Hanne M. Hoffmann, Anita K. Iyer, Melissa J. Brayman, Cindy Ngo, Mary Jean Sunshine, et Pamela L. Mellon. « Chromatin Status and Transcription Factor Binding to Gonadotropin

- Promoters in Gonadotrope Cell Lines ». *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 15, n° 1 (24 octobre 2017): 86. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0304-z>.
- Xing, Yewei, Ken-Ichirou Morohashi, Holly A. Ingraham, et Gary D. Hammer. « Timing of Adrenal Regression Controlled by Synergistic Interaction between Sf1 SUMOylation and Dax1 ». *Development (Cambridge, England)* 144, n° 20 (15 octobre 2017): 3798-3807. <https://doi.org/10.1242/dev.150516>.
- Yi, Ping, Zhao Wang, Qin Feng, Chao-Kai Chou, Grigore D. Pintilie, Hong Shen, Charles E. Foulds, et al. « Structural and Functional Impacts of ER Coactivator Sequential Recruitment ». *Molecular Cell* 67, n° 5 (7 septembre 2017): 733-743.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.026>.
- Yin, Yimeng, Ekaterina Morgunova, Arttu Jolma, Eevi Kaasinen, Biswajyoti Sahu, Syed Khund-Sayeed, Pratyush K. Das, et al. « Impact of Cytosine Methylation on DNA Binding Specificities of Human Transcription Factors ». *Science (New York, N.Y.)* 356, n° 6337 (5 mai 2017). <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>.
- Yun, Won Ju, Yea Woon Kim, Yujin Kang, Jungbae Lee, Ann Dean, et AeRi Kim. « The Hematopoietic Regulator TAL1 Is Required for Chromatin Looping between the β -Globin LCR and Human γ -Globin Genes to Activate Transcription ». *Nucleic Acids Research* 42, n° 7 (avril 2014): 4283-93. <https://doi.org/10.1093/nar/gku072>.
- Zaret, Kenneth S., Jonathan Lerner, et Makiko Iwafuchi-Doi. « Chromatin Scanning by Dynamic Binding of Pioneer Factors ». *Molecular Cell* 62, n° 5 (2 juin 2016): 665-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.024>.
- Zaret, Kenneth S., et Susan E. Mango. « Pioneer Transcription Factors, Chromatin Dynamics, and Cell Fate Control ». *Current Opinion in Genetics & Development* 37 (avril 2016): 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.12.003>.
- Zemach, Assaf, Ivy E. McDaniel, Pedro Silva, et Daniel Zilberman. « Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation ». *Science (New York, N.Y.)* 328, n° 5980 (14 mai 2010): 916-19. <https://doi.org/10.1126/science.1186366>.
- Zhang, Shu, Yueli Cui, Xinyi Ma, Jun Yong, Liying Yan, Ming Yang, Jie Ren, Fuchou Tang, Lu Wen, et Jie Qiao. « Single-Cell Transcriptomics Identifies Divergent Developmental Lineage Trajectories during Human Pituitary Development ». *Nature Communications* 11, n° 1 (19 octobre 2020): 5275. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19012-4>.
- Zhang, Yingying, Renata Jurkowska, Szabolcs Soeroes, Arumugam Rajavelu, Arunkumar Dhayalan, Ina Bock, Philipp Rathert, et al. « Chromatin Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L Is Guided by Interaction of the ADD Domain with the Histone H3 Tail ». *Nucleic Acids Research* 38, n° 13 (juillet 2010): 4246-53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq147>.
- Zhang, Yong, Tao Liu, Clifford A. Meyer, Jérôme Eeckhoute, David S. Johnson, Bradley E. Bernstein, Chad Nusbaum, et al. « Model-Based Analysis of ChIP-Seq (MACS) ». *Genome Biology* 9, n° 9 (2008): R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.
- Zhang, Yu, Di Zhang, Qian Li, Jing Liang, Luyang Sun, Xia Yi, Zhe Chen, et al. « Nucleation of DNA Repair Factors by FOXA1 Links DNA Demethylation to Transcriptional Pioneering ». *Nature Genetics* 48, n° 9 (septembre 2016): 1003-13. <https://doi.org/10.1038/ng.3635>.
- Zhang, Yusheng, Ho Lam Chan, Liliana Garcia-Martinez, Daniel L. Karl, Natalia Weich, Joyce M. Slingerland, Ramiro E. Verdun, et Lluís Morey. « Estrogen Induces Dynamic ER α and RING1B Recruitment to Control Gene and Enhancer Activities in Luminal Breast Cancer ». *Science Advances* 6, n° 23 (juin 2020): eaaz7249. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7249>.
- Zhao, L., M. Bakke, Y. Krimkevich, L. J. Cushman, A. F. Parlow, S. A. Camper, et K. L. Parker. « Hypomorphic Phenotype in Mice with Pituitary-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 ». *Genesis (New York, N.Y.): 2000* 30, n° 2 (juin 2001): 65-69. <https://doi.org/10.1002/gene.1034>.
- Zhao, L., M. Bakke, Y. Krimkevich, L. J. Cushman, A. F. Parlow, S. A. Camper, et K. L. Parker. « Steroidogenic Factor 1 (SF1) Is Essential for Pituitary Gonadotrope Function ». *Development (Cambridge, England)* 128, n° 2 (janvier 2001): 147-54.
- Zhao, L., M. Bakke, et K. L. Parker. « Pituitary-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 185, n° 1-2 (20 décembre 2001): 27-32. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00621-9](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00621-9).
- Zhao, Liping, Ki Woo Kim, Yayoi Ikeda, Kimberly K. Anderson, Laurel Beck, Stephanie Chase, Stuart A. Tobet, et Keith L. Parker. « Central Nervous System-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 Results in Increased Anxiety-like Behavior ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22, n° 6 (juin 2008): 1403-15. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0034>.

- Zhou, D., et S. Chen. « PNR2 Is a 16 KDa Coactivator That Interacts with Nuclear Receptors through an SH3-Binding Motif ». *Nucleic Acids Research* 29, n° 19 (1 octobre 2001): 3939-48. <https://doi.org/10.1093/nar/29.19.3939>.
- Zubair, Mohamad, Satoru Ishihara, Sanae Oka, Katsuzumi Okumura, et Ken-ichirou Morohashi. « Two-Step Regulation of Ad4BP/SF-1 Gene Transcription during Fetal Adrenal Development: Initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 Complex and Maintenance via Autoregulation by Ad4BP/SF-1 ». *Molecular and Cellular Biology* 26, n° 11 (juin 2006): 4111-21. <https://doi.org/10.1128/MCB.00222-06>.

