

Abréviations

α GSU : Alpha glycoprotéine

α -MSH : *Alpha Melanocyte Stimulating Hormone*

ACTH : Adrénocorticotrophine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Alpha GSU : Sous-unité alpha Glycoprotéique

AALS : *Anionic Acid Labile Surfactant*

ALS : *Acid Labile Subunit*

AMP_C : AMP cyclique

ARN : Acide ribonucléique

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

CBP : *CREB Binding Protein*

C/EBP α : *CCAAT/Enhancer Binding Protein α*

CPHD : *Combined Pituitary Hormone Deficiency* ou Déficit Combiné en Hormones Pituitaires

CREB : *cAMP Responding Element Binding Protein*

CS : Hormone chorionique somatomammotropique

DE : *Distal enhancer*

DO : Densité optique

DS : Déviation Standard

DSO : Dysplasie Septo-Optique

DTT : Dithiothréitol

e : jour de développement embryonnaire chez la souris

EE : *Early enhancer*

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FSH : *Follicle-Stimulating Hormone* ou hormone folliculostimulante

GH : *Growth Hormone* ou hormone de croissance

GHBP : *Growth Hormone Binding Protein*

GHRH : Somatolibérine ou *Growth Hormone Releasing Hormone*

GHRHR : *Growth Hormone Releasing Hormone Receptor*

GHSR : *Growth Hormone Secretagogue Receptor*

GST : *Glutathione S-transferase*

HAT : Histone acétyltransférase

HD : Homéodomaine

HDAC : Histone désacétylase

HES : *Hairy Enhancer of Split*

Herp : *Hes-Related protein*

Hip : *Huntingtin interacting protein*

HMG : *High Mobility Group*

HS : Site d'hypersensibilité à la DNase I

IGHD : *Isolated Growth Hormone Deficiency* ou Déficit Isolé en Hormone de Croissance

IGF-1 : *Insulin-like Growth Factor*

IGFBP : *IGF-1 Binding Protein*

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IRM : Imagerie par résonance magnétique

kb : Kilobases

kDa : KiloDalton

KO : *Knock Out*

LCR : Locus Control Region

LIM : Acronyme de Lin11, Isl-1 et Mec-3

LH : *Luteinising Hormone* ou hormone luteïnisante

LCR : *Locus Control Region*

MSH : *Melano Stimulating Hormone*

N-Cor : *nuclear receptor co-repressor*

pb : Paire de bases

POU : Acronyme de Pit1, Oct1 et Unc86

POU_H : POU-Homédomaine

POU_S : POU-Spécifique

POMC : Pro-OpioMélanocortine

PROP1 : *Prophet of Pit1*

PRL : Prolactine

RAR/RXR : Récepteurs à l'acide rétinoïque

Rpx : *Rathke's pouch homeobox*

RU : Unité de résonance

SD : Domaine SIX

Shh : *Sonic Hedgehog*

So : *sine oculi*

SRY : *Sex determining region on Y-box*

TAD : Domaine de transactivation

TFA : acide trifluoroacétique

TH : Hormones thyroïdiennes

TSH : *Thyroid Stimulating Hormone* ou thyroïdostimuline

TH : Hormone thyroïdienne ou *Thyroid Hormone*

TR : Récepteur aux hormones thyroïdiennes

Shh : *Sonic Hedgehog*

VDR : Récepteur à la vitamine D

Sommaire

INTRODUCTION	1
1. CONTROLE GENETIQUE DU DEVELOPPEMENT ANTEHYPOPHYSIAIRE ET PATHOLOGIE HUMAINE	7
1.1. Signalisation au cours de l'organogenèse antéhypophysaire	7
1.2. Facteurs de transcription nécessaires au développement antéhypophysaire et pathologies humaines	12
1.2.1. OTX2	16
1.2.2. SOX2 – SOX3	16
1.2.3. SIX	18
1.2.4. GLI	18
1.2.5. PITX1 - PITX2	19
1.2.6. HESX1	20
1.2.7. Protéines LIM	21
1.2.8. PROP1	25
1.2.9. POU1F1	26
2. IMPLICATION DES GENES DE L'AXE SOMATOTROPE EN PATHOLOGIE	35
2.1. GHRHR	35
2.2. GHSR	37
2.3. GH	37
2.4. Facteurs de transcription et IGHD	38
3. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE <i>GH</i> HUMAIN	39
3.1. L'hormone de croissance	39
3.2. Interactions fonctionnelles impliquant POU1F1	49
OBJECTIFS	61
MATÉRIELS ET MÉTHODES	64
1. ANALYSE GENETIQUE	65
1.1 SIX6	65
1.2. LHX2	67
1.3 POU1F1 et LCR <i>GH</i>	67
2. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE POU1F1	70
2.1 Synthèse des cibles ADN	70
2.2 Protéines recombinantes	73
2.3 Construction des plasmides – Mutagenèse dirigée	74
2.4 Production de la protéine recombinante	77
2.5 Purification des protéines recombinantes	79

2.6 Concentration des protéines et dialyse	80
2.7 Electrophorèse et western blot	80
2.8 Préparation des extraits nucléaires	81
2.9 BIAcore	81
2.10 Spectrométrie de masse	82
3. CRISTALLOGRAPHIE.....	84
3.1 Clonage du TAD de POU1F1	84
3.2 Expression du TAD de POU1F1.....	84
3.3 Purification du TAD de POU1F1.....	86
3.4 Cristallisation.....	88
RESULTATS	89
1. ANALYSE DE GENES CANDIDATS POUR LES MALADIES DE LA CROISSANCE	90
1.1 Recherche de mutations du gène <i>SIX6</i>	91
1.2 Recherche de mutations du gène <i>LHX2</i>	106
ARTICLE 1 : SCREENING OF <i>LHX2</i> IN PATIENTS PRESENTING GROWTH RETARDATION WITH POSTERIOR PITUITARY AND OCULAR ABNORMALITIES	111
1.3 Recherche de mutations du gène <i>LHX3</i>	132
ARTICLE 2 : SYMPTOMATIC HETEROZYGOTES AND PRENATAL DIAGNOSES IN A NON-CONSANGUINEOUS FAMILY WITH SYNDROMIC COMBINED PITUITARY HORMONE DEFICIENCY RESULTING FROM TWO NOVEL <i>LHX3</i> MUTATIONS	133
2. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE POU1F1 AU LOCUS <i>GH</i> HUMAIN	138
2.1 Recherche d'anomalies moléculaires de <i>POU1F1</i> et du LCR <i>GH</i> chez des patients présentant un IGHD	140
2.2 Recherche de partenaires de POU1F1	142
2.2.1 Stratégie	142
2.2.2 Résultats.....	144
<i>Production et purification des protéines POU1F1</i>	144
<i>Etude d'interaction de POU1F1 sur les séquences d'ADN cibles</i>	150
<i>Interaction ADN-protéines</i>	150
<i>Cinétique</i>	155
<i>Recherche de partenaires de POU1F1</i>	159
<i>Mise au point et validation de l'approche « Recovery »</i>	159
<i>« Recovery » à partir d'extraits nucléaires</i>	163
2.3 Etude de la structure tridimensionnelle du domaine de transactivation de POU1F1	165
DISCUSSION	172
CONCLUSION GENERALE.....	180

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	182
---	------------

ANNEXES	206
----------------------	------------

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

La croissance est un processus physiologique qui permet le développement de l'organisme. La taille d'un individu est un élément phénotypique visible qui est étudié depuis longtemps du fait de l'existence d'anomalies du développement comme le nanisme. Une courbe de croissance de référence a été déterminée en fonction des tailles moyennes retrouvées dans la population. Il y a retard de croissance lorsque la taille de l'enfant est au moins inférieure à -2 DS (déviations standard) par rapport à la moyenne des courbes normales pour l'âge et le sexe. La croissance est permise en partie par l'action de l'hormone de croissance ou GH (*Growth Hormone*) qui est sécrétée par la glande pituitaire.

L'hypophyse est une glande endocrine régulant les fonctions physiologiques de base incluant la croissance, la réponse au stress, la reproduction, l'homéostasie et la lactation. Elle permet de relayer les signaux de l'hypothalamus jusqu'aux organes périphériques cibles (**Figure 1**). Cette glande est située dans la selle turcique, une cavité de l'os sphénoïde localisée à la base du cerveau. La glande mature est composée de l'adénohypophyse qui est constituée de l'antéhypophyse et du lobe intermédiaire, et de la neurohypophyse qui correspond au lobe postérieur. Chez l'homme, le lobe intermédiaire est présent chez le nouveau-né mais régresse au cours du temps pour disparaître complètement à l'âge adulte.

L'antéhypophyse contient une population hétérogène de cinq types cellulaires différenciés caractérisés par la nature de l'hormone produite et sécrétée. Les cellules somatotropes sécrètent la GH et régulent la croissance et le métabolisme. Les cellules lactotropes permettent à la prolactine (PRL) de réguler la production de lait chez la femme. Les cellules corticotropes sécrètent l'ACTH (ou adrénocorticotrophine), produit protéolytique de la POMC (Pro-OpioMélanocortine), qui stimule la glande surrénale pour la production de cortisol. La TSH (thyroïdostimuline ou *Thyroid Stimulating Hormone*) est produite par les cellules thyroïdotropes et permet le développement des follicules thyroïdiens et la sécrétion d'hormones thyroïdiennes (TH). Les cellules gonadotropes produisent la FSH (*Follicle-Stimulating Hormone* ou hormone folliculostimulante) et la LH (*Luteinising Hormone* ou hormone luteïnisante) qui agissent sur les gonades pour initier la maturation sexuelle et le maintien des fonctions reproductrices. La TSH, la LH et la FSH sont des glycoprotéines hétérodimériques composées d'une sous-unité protéique commune appelée alpha-glycoprotéine ou α -GSU [Voss et Rosenfeld, 1992] et d'une sous-unité bêta spécifique de l'hormone (TSH β , LH β , FSH β).

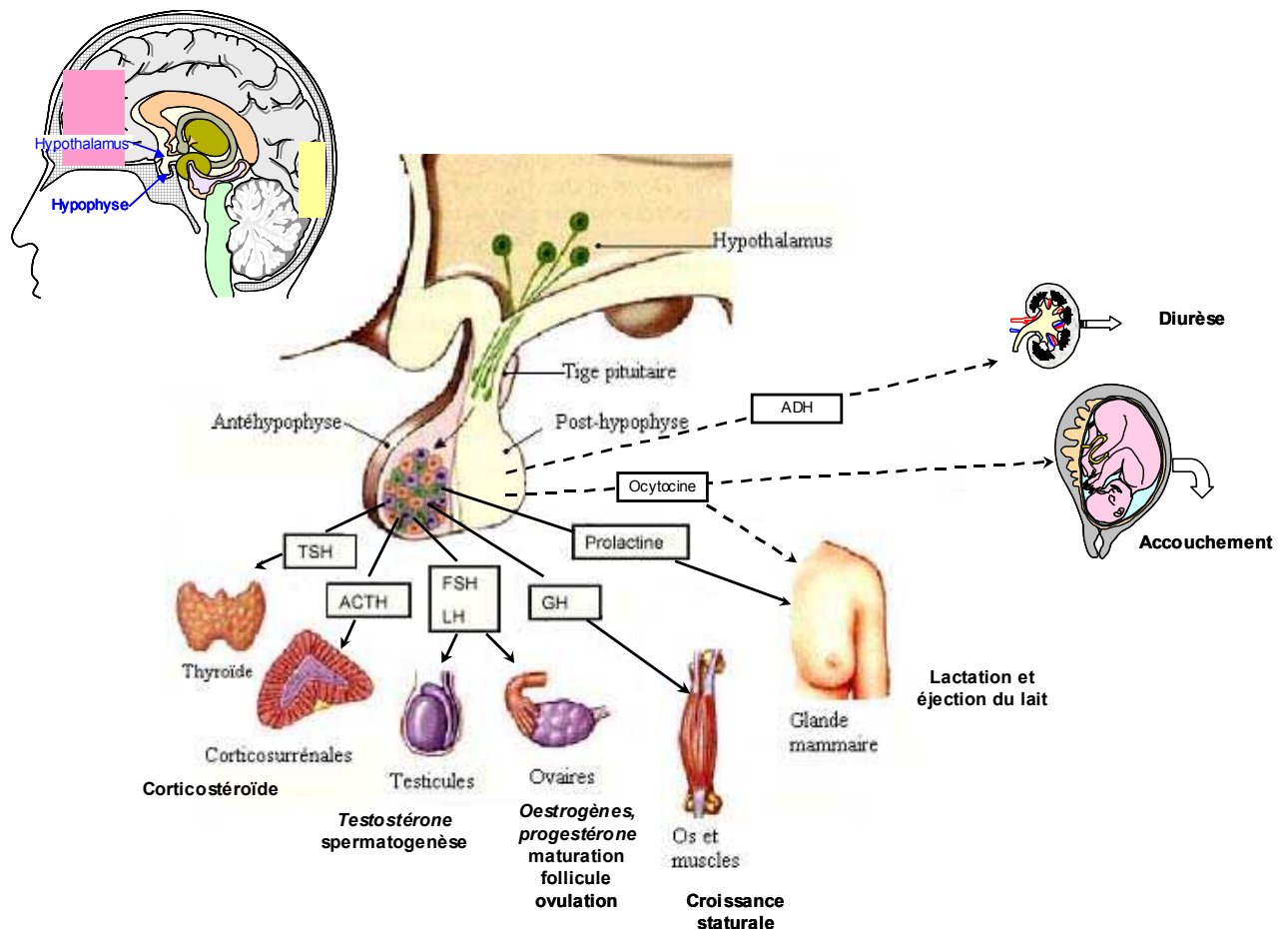


Figure 1 : Représentation schématique de la glande pituitaire et de l'action des hormones sécrétés sur les organes cibles.

TSH : *Thyroid Stimulating Hormone* ou thyroïdestimuline; ACTH : Adrénocorticotrophine ; FSH : *Follicle-Stimulating Hormone* ou hormone folliculostimulante; LH : *Luteinising Hormone* ou hormone luteïnisante ; GH : *Growth Hormone* ou hormone de croissance ; ADH : Hormone anti-diurétique

(d'après : www.sosinf.org)

Le lobe intermédiaire sécrète l'*alpha melanocyte-stimulating hormone* (α -MSH) régulant la production et la maturation de mélanine par les mélanocytes, et produit également certaines endorphines.

Le lobe postérieur est composé de terminaisons axonales dont les corps cellulaires situés dans l'hypothalamus sécrètent l'ocytocine nécessaire à la parturition et la lactation ainsi que la vasopressine impliquée dans la régulation de la balance osmotique. Les connexions neuronales et vasculaires se font via la tige pituitaire qui permet le transport de toutes les informations de l'hypothalamus à la glande pituitaire.

Des phénomènes complexes dépendant de facteurs métaboliques, de l'action d'hormones hypothalamiques, de nombreux modulateurs hormonaux ainsi que de mécanismes de rétrocontrôle positif et négatif permettent la sécrétion de la GH. La libération de la GH est contrôlée par la balance entre la stimulation par la somatolibérine ou GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) et la ghréline (principalement d'origine gastrique) et par l'inhibition par la somatostatine. Le GHRH et la ghréline se lient à leur récepteur spécifique le GHRHR (*Growth Hormone Releasing Hormone Receptor*) [Wajnrajch et al., 1994] et le GHSR (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*) respectivement, ce qui entraîne la synthèse de la GH. La GH se lie à son récepteur présent à la surface de ses tissus cibles notamment au niveau du foie (**Figure 2**). L'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*), synthétisée principalement par le foie, circule sous forme liée à l'IGFBP (*IGF-1 Binding Protein*) ou sous la forme d'un complexe ternaire composé de l'IGFBP et d'ALS (*Acid Labile Subunit*). L'IGF-1 inhibe la sécrétion du GHRH et de la GH par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (**Figure 2**). La somatostatine, hormone hypophysaire, inhibe également la sécrétion de la GH via sa fixation sur des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules somatotropes.

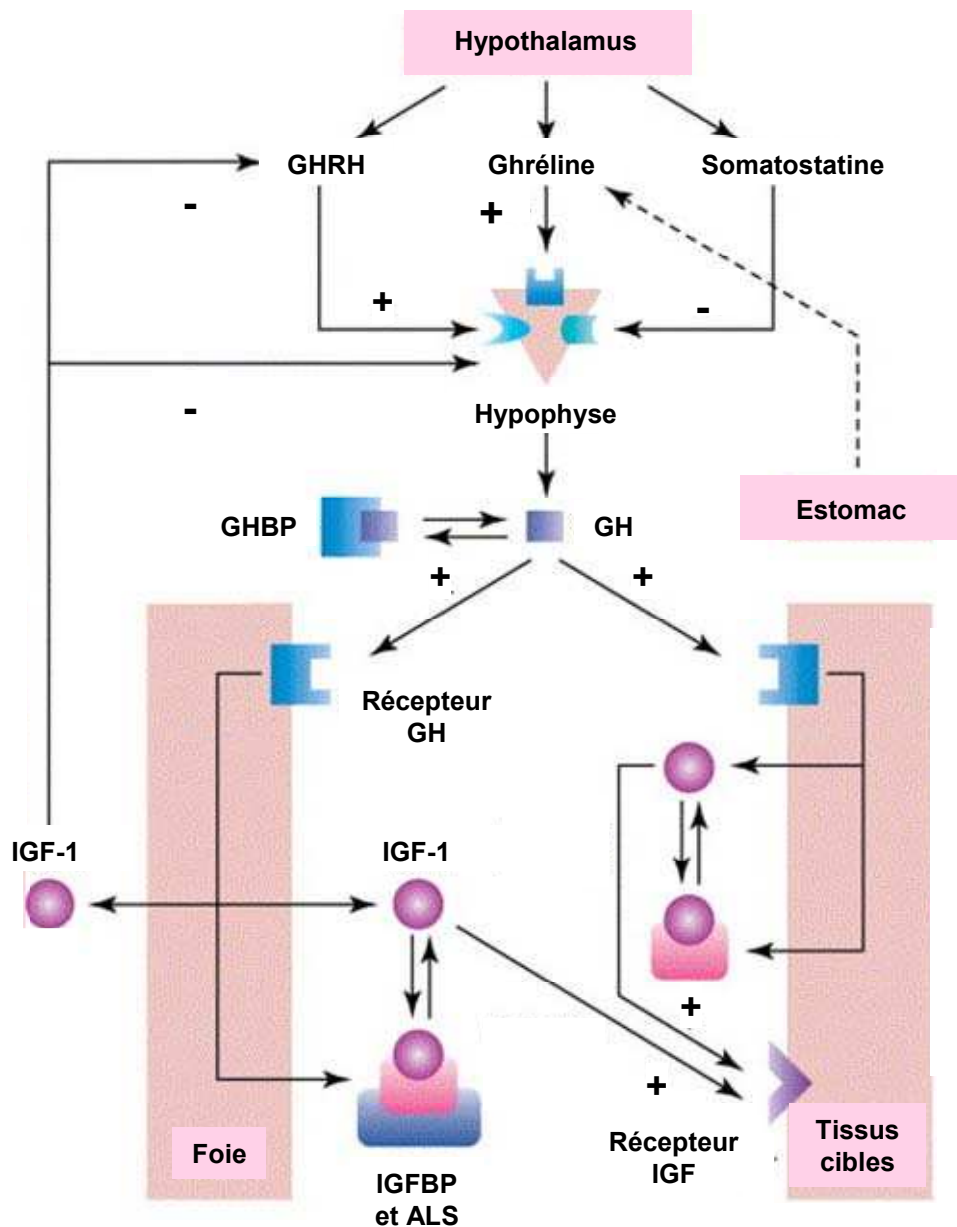


Figure 2 : Axe somatotrope. La ghréline et le GHRH permettent la stimulation de la synthèse et de la sécrétion de la GH. La GH circule principalement sous forme liée à la GHBP et se lie à son récepteur présent à la surface de ses tissus cibles dont le foie. La somatostatine sécrétée par l'hypothalamus et l'IGF-1 qui provient principalement du foie, permettent l'inhibition de la sécrétion du GHRH et de la GH par un mécanisme de rétrocontrôle négatif.

ALS : Acid Labile Subunit ; GHBP : GH Binding Protein; GHRH : GH Releasing Hormone ; IGF : Insulin-like Growth Factor ; IGFBP : IGF-1 Binding Protein.

D'après [Holt, 2002].

D'un point de vue embryonnaire, la glande pituitaire a une double origine : les lobes antérieur et intermédiaire dérivent de l'ectoderme oral alors que la posthypophyse dérive du neuroectoderme. Le développement de cette glande commence à être bien connu grâce aux différentes études réalisées chez de nombreux modèles animaux, notamment la souris, et se fait selon une continuité bien définie d'événements [Sheng et al., 1997; Catala et Trouillas, 2007].

Chez la souris, le développement hypophysaire peut se décomposer en plusieurs étapes (**Figure 3**) :

- la détermination du territoire présomptif de l'antéhypophyse, la placode hypophysaire, entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour de développement embryonnaire en réponse à des signaux inducteurs provenant du diencephale
- la formation de la poche de Rathke à partir d'une évagination de l'ectoderme oral qui est en contact avec le diencephale en formation (e9,5)
- l'apposition séquentielle des cellules antéhypophysaires ayant achevé leur différenciation : les cellules corticotropes et mélanotropes se situent dans la zone dorsale de l'antéhypophyse, les cellules somatotropes et lactotropes dans la zone intermédiaire alors que les cellules thyrotropes et gonadotropes se développent dans la zone antéhypophysaire ventrale (e13,5).

A e15,5, l'hypophyse est clairement individualisée [Kioussi et al., 1999]. L'expression de l'hormone de croissance et de la prolactine montre la différenciation des lignées somatotropes et lactotropes respectivement et commence à e15,5 chez la souris. A ce stade, les cellules somatotropes augmentent considérablement en nombre et s'étendent dans les aires centrales et latérales de l'antéhypophyse. Les cellules lactotropes restent localisées dans une zone médiane adjacente plus restreinte à la surface ventrale du lobe intermédiaire. Les cellules gonadotropes sont les dernières à émerger.

En parallèle, l'infundibulum se développe à partir du neuroectoderme pour donner progressivement la post-hypophyse et la tige pituitaire.

L'identification d'anomalies génétiques à l'origine de maladies de la croissance est complexe du fait du grand nombre de gènes impliqués dans le développement de l'antéhypophyse, lieu de synthèse de l'hormone de croissance, et dans le fonctionnement de l'axe somatotrope.

1. Contrôle génétique du développement antéhypophysaire et pathologie humaine

Le développement pituitaire chez la souris est complexe et est soumis à une régulation fine des voies de signalisation et des facteurs de transcription aboutissant à la formation d'une hypophyse différenciée [Dasen et Rosenfeld, 1999]. Depuis la placode hypophysaire jusqu'à l'obtention de l'antéhypophyse différenciée (ex poche de Rathke), de nombreux facteurs de transcription agissent et interagissent entre eux. Ces facteurs de transcription dictent la différenciation et la prolifération cellulaire au sein de l'antéhypophyse.

1.1. Signalisation au cours de l'organogenèse antéhypophysaire

Dès les premières étapes du développement pituitaire, les molécules de signalisation diffusent du diencéphale ventral (Bmp4, Fgf8, Wnt5 α), de l'ectoderme oral (*Sonic Hedgehog*, Shh), du mésenchyme avoisinant (Bmp2) et de la poche de Rathke elle-même (Bmp2, Wnt4). Les facteurs diffusibles ont pour effet d'établir l'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription qui déterminent ensuite la structure de la glande pituitaire (**Figure 3**). Leurs rôles au cours de l'organogenèse ont été démontrés dans différents modèles animaux.

Shh est exprimé au cours du développement précoce dans l'ensemble de l'ectoderme oral puis son domaine d'expression se réduit. Cependant, chez la souris, son expression n'est pas détectée dans la poche de Rathke, créant ainsi une frontière entre l'antéhypophyse et le reste de l'ectoderme [Treier et al., 2001]. La surexpression de la protéine Hip (*Huntingtin interacting protein*), antagoniste de Shh, au sein de l'ectoderme oral et de la poche de Rathke, bloque la signalisation Shh et entraîne un arrêt du développement de la poche de Rathke chez les embryons. Les voies Bmp4 et Fgf permettent tout de même la formation d'une poche rudimentaire bien qu'elle soit sévèrement hypoplasique et l'expression du facteur de transcription Lhx3 est graduellement perdue excepté dans les cellules en contact avec l'infundibulum [Treier et al., 2001].

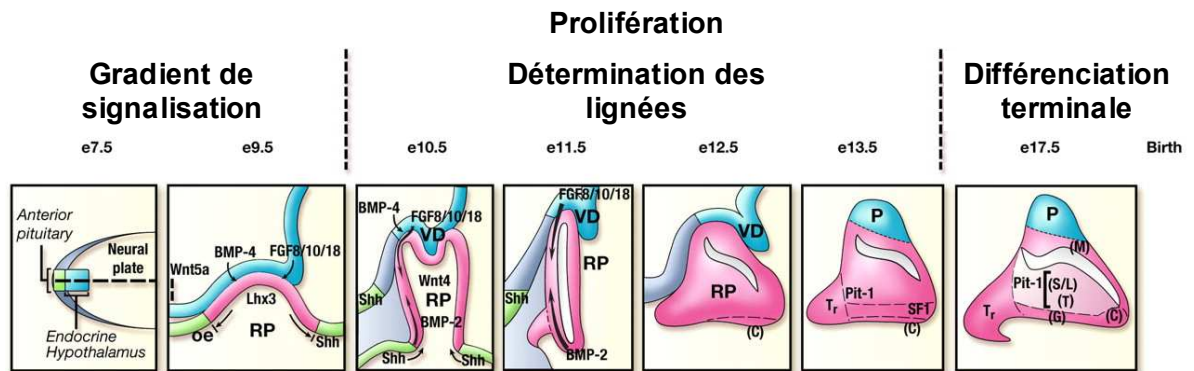


Figure 3 : Molécules de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans le développement pituitaire. Shh est exprimé dans l'ectoderme oral excepté dans la poche de Rathke créant une frontière entre les domaines cellulaires exprimant Shh ou non. Le diencéphale ventral exprime Bmp4, Fgf8, Wnt5 et entre en contact direct avec l'ectoderme oral et induit la formation de la poche de Rathke. A e10,5, le gradient de Bmp2 dans la poche de Rathke est ventro-dorsal. (D'après [Zhu et al., 2007]).

La voie de signalisation Wnt canonique qui est dépendante de la β -caténine – à distinguer des voies Wnt non canonique indépendante de la β -caténine comme la voie de la polarité planaire cellulaire – est impliquée dans l'embryogenèse et dans les mécanismes de prolifération, de différenciation et de polarisation cellulaire au cours de l'embryogenèse [Huelsenken et Birchmeier, 2001]. Dans la poche de Rathke, Wnt4 est exprimé à partir de e9,5. L'invalidation génétique de Wnt4 chez les souris entraîne une hypoplasie hypophysaire mais l'origine de ce défaut n'est pas claire. En effet, dans un premier temps, l'invalidation de Wnt4 avait montré une diminution importante de l'expression d' α -Gsu, de Gh et de Tsh β [Treier et al., 1998] mais une étude plus récente, utilisant les mêmes souris mutantes [Stark et al., 1994], montre une diminution de l'expression du facteur de transcription pituitaire Pou1f1 sans diminution d' α -Gsu [Potok et al., 2008]. La voie Wnt dépendante de la β -caténine peut coopérer avec d'autres voies de signalisation, notamment la voie Notch.

Quatre récepteurs Notch sont présents chez les mammifères. Les cibles de Notch les mieux caractérisées sont les membres de la famille HES (*Hairy enhancer of split*), Hes1, Hes5 et les membres de la famille Herp (*Hes-related protein*). Lors du développement pituitaire, la voie de signalisation Notch est diminuée ventralement mais est maintenue dorsalement autour de la lumière de la poche de Rathke. La signalisation Notch pourrait être nécessaire pour l'émergence des cellules précurseurs dépendantes de Pou1f1 [Zhu et al., 2006].

Bmp4 (*Bone Morphogenetic Protein*) est une molécule de signalisation précoce connue pour être exprimée au niveau de l'infundibulum à partir de e8,5 et jusqu'à e14,5 [Davis et Camper, 2007; Ericson et al., 1998]. La délétion complète de Bmp4, chez la souris, conduit à une létalité embryonnaire. Les analyses histologiques des rares embryons survivants à e10,5 ont montré l'absence de la formation de la poche de Rathke [Takuma et al., 1998]. Une étude de souris transgéniques qui expriment de manière ectopique Noggin, l'antagoniste de Bmp4, au sein de l'ectoderme oral et de la poche de Rathke, a permis d'observer, chez les embryons, un arrêt précoce du développement de la future antéhypophyse à e10,5 [Treier et al., 1998]. Bmp4 est nécessaire à l'induction et au maintien de la poche de Rathke.

Fgf8 (*Fibroblast Growth Factor*) est également nécessaire à la formation de l'antéhypophyse et a un rôle dans la détermination des cellules antéhypophysaires

dorsales. Vingt-quatre heures après le début de l'expression de Bmp4, Fgf8 commence à s'exprimer au niveau de l'infundibulum [Ericson et al., 1998; Treier et al., 1998, 2001]. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur des Fgf mimant la perte de la signalisation Fgf, entraîne la diminution de l'expression de Lhx3, ainsi que la différenciation ectopique des cellules thyroïdiques et corticotropes le long de la région dorsale avec une prolifération significativement réduite [Norlin et al., 2000]. Des souris transgéniques, qui surexpriment Fgf8 sous le contrôle de l'élément régulateur α -GSU, ont également montré une augmentation des cellules en position dorsale (corticotropes et mélanotropes) alors que les cellules en position ventrale (somatotropes, lactotropes et thyroïdiques) ne se développent pas [Treier et al., 1998, 2001].

A e10,5, un autre membre de la famille BMP, Bmp2, s'exprime dans la zone de l'ectoderme ventral qui n'exprime pas Shh. Les souris *Bmp2*^{-/-} présentent un nanisme et une antéhypophyse hypoplasique. L'expression de Bmp2 n'est plus détectable à e15,5-e16,5 lorsque les cellules dépendantes de Pou1f1 sont différenciées. Au contraire, le maintien de l'expression de Bmp2 sous le contrôle du promoteur α -Gsu résulte en une glande hyperplasique avec absence des marqueurs de différenciation Gh, Prl et Tsh β . Seules les cellules exprimant l'ACTH semblent normales. L'atténuation de l'expression de Bmp2 semble donc nécessaire à la différenciation des cellules somatotropes, lactotropes et thyroïdiques [Treier et al., 1998].

L'action de ces différentes molécules diffusibles de signalisation qui agissent selon un gradient spatio-temporel précis est nécessaire au développement correct de l'antéhypophyse (**Figure 3**). Néanmoins, ils ne sont pas suffisants et de nombreux facteurs de transcription sont également impliqués dans le développement pituitaire.

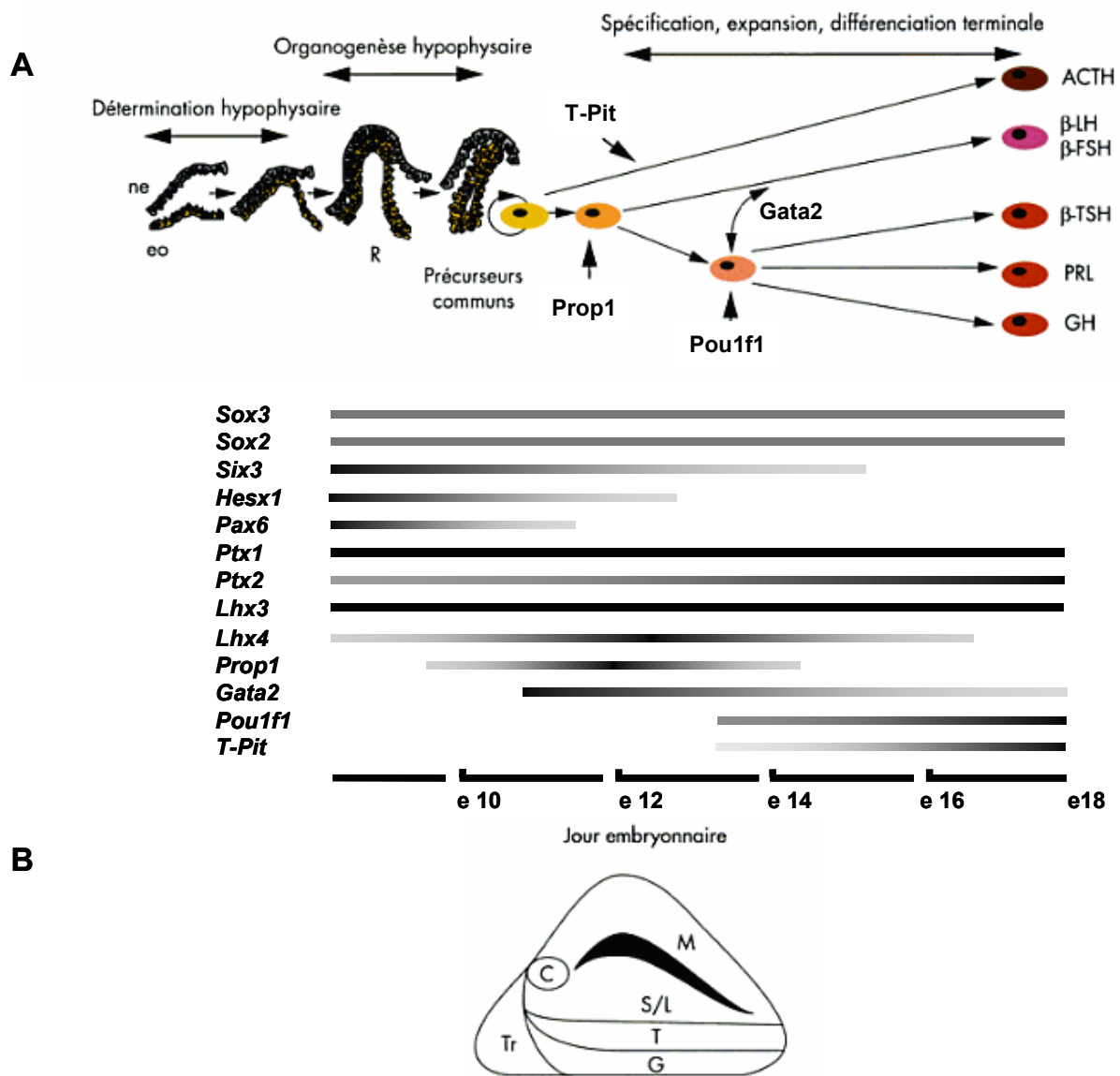


Figure 4 : Modèle de développement antéhypophysaire chez la souris montrant l'apparition séquentielle des cellules antéhypophysaires à partir d'une cellule souche commune à la formation de l'hypophyse. a : Cascade de facteurs de transcription. b : Répartition des cellules antéhypophysaires. ne : neuroectoderme, eo : ectoderme oral, R : Poche de Rathke, Tr : cellules thyroïdiques rostrales, T : cellules thyroïdiques, C : cellules corticotropes, M : cellules mélanotropes, S/L : cellules somatotropes et lactotropes, G : cellules gonadotropes, e : jour de développement embryonnaire chez la souris (Selon [Rappaport et Amselem, 2001]).

1.2. Facteurs de transcription nécessaires au développement antéhypophysaire et pathologies humaines

Des modèles murins mutés spontanément (souris *Ames*, *Snell Jackson*) ou invalidées génétiquement par recombinaison homologue ont permis d'évaluer l'importance fonctionnelle des gènes intervenant au cours du développement.

Hesx1, *Lhx2*, *Lhx3*, *Lhx4*, *Pitx1*, *Pitx2*, *T-Pit*, *Six3*, *Pax6*, *Gata2*, *Otx2*, *Sox2*, *Sox3*, *Prop1* et *Pou1f1* sont des gènes codant pour des facteurs de transcription à domaine « homéo » exprimés à différents stades du développement. Ils agissent sur l'ADN et/ou d'autres protéines afin de réguler par activation ou par inhibition la transcription de leurs gènes cibles. Les analyses histologiques par hybridation *in situ* et immunohistochimiques ont permis l'identification du profil d'expression spatio-temporel de chacun de ces gènes.

Certains de ces facteurs de transcription sont regroupés en famille en fonction de la séquence de l'homéodomaine (HD) ou des domaines associés :

- les facteurs de transcription à domaine HD-PAIRED (*Prop1*, *Hesx1*, *Pitx1*, *Pitx2*, *Otx2*, *Pax6*)
- les facteurs de transcription à domaine HD-POU (*Pou1f1*)
- les facteurs de transcription à domaine HD-HMG (*Sox2*, *Sox3*)
- les facteurs de transcription à domaine LIM (*Lhx2*, *Lhx3*, *Lhx4*)
- les facteurs de transcription à domaine SIX (*Six3*).

Chacun de ces facteurs de transcription a un rôle précis pendant un intervalle de temps plus ou moins prolongé (**Figure 4**). Une anomalie de l'un de ces facteurs de transcription entraîne chez la souris un développement hypophysaire anormal (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Phénotype des souris invalidées ou mutées spontanément pour différents facteurs de transcription impliqués dans le développement pituitaire

Gène	Modèle animal	Phénotype	Référence
<i>Hesx1</i>	<i>Hesx1</i> ^{-/-}	Anophtalmie, agénésie du corps calleux, absence de septum lucidum, aplasie antéhypophysaire	[Dattani et al., 1998]
<i>Otx2</i>	<i>Otx2</i> ^{-/-}	Absence de placodes olfactives et optiques	[Acampora et al., 1995]
<i>Sox2</i>	<i>Sox2</i> ^{-/-}	Chez hétérozygote, ralentissement de la croissance, fertilité réduite, anomalie du système nerveux central, anophtalmie, hypoplasie antéhypophysaire, réduction en nombre de tous les types cellulaires	[Kelberman, 2006]
<i>Sox3</i>	<i>Sox3</i> ⁻	Faible croissance, anomalies cranio-faciales, agénésie du corps calleux, anomalie de l'hypothalamus	[Rizzoti et al., 2004]
<i>Lhx3</i>	<i>Lhx3</i> ^{-/-}	Hypoplasie de l'antéhypophyse, réduction en nombre de tous les types cellulaires pituitaires (léthal)	[Sheng et al., 1996]
<i>Lhx4</i>	<i>Lhx4</i> ^{-/-}	Hypoplasie de l'antéhypophyse, réduction en nombre de tous les types cellulaires pituitaires (phénotype moins sévère que pour l'invalidation de <i>Lhx3</i> , cependant léthal)	[Sheng et al., 1997]
<i>Prop1</i>	Souris <i>Ames</i>	Hypoplasie antéhypophysaire, pas d'activation de Pit1, réduction en nombre importante des cellules somatotropes, lactotropes, thyrotropes, corticotropes, et moindre des cellules gonadotropes	[Sornson et al., 1996]
<i>Pit1</i>	Souris <i>Snell</i> et <i>Jackson</i>	Hypoplasie antéhypophysaire, réduction en nombre des cellules somatotropes, lactotropes, thyrotropes	[Li et al., 1990]

Tableau 2 : Phénotypes cliniques, mode de transmission et aspects IRM en fonction des facteurs de transcription hypophysaires impliqués dans le déficit hypophysaire (DSO : Dysplasie septo-optique)

Facteurs de transcription	Mode de transmission	Déficit					Aspect antéhypophyse	Aspect posthypophyse	Autres anomalies
		GH	TSH	LH-FSH	ACTH	PRL			
<i>POU1F1</i>	Récessif ou dominant	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Hypoplasique (parfois)	Normale	
<i>PROP1</i>	Récessif	Oui	Oui	Oui	Variable	Oui	Hyperplasique ou hypoplasique ou normale	Normale	
<i>HESX1</i>	Récessif ou dominant	Oui	Variable	Variable	Variable	Variable	Hypoplasie	Ectopique ou en place	DSO inconstante
<i>LHX3</i>	Récessif	Oui	Oui	Oui	Variable	Oui	Hypoplasique, hyperplasique ou normale	Normale	Anomalie de la rotation cervicale et surdité variable
<i>LHX4</i>	Dominant	Oui	Variable	Variable	Variable	Non	Hypoplasique ou hyperplasique	Ectopique ou en place	Malformation cérébrale
<i>SOX3</i>	Récessif lié à l'X	Oui	Variable	Variable	Variable	Variable	Hypoplasie	Ectopique ou en place	Retard psychomoteur (parfois)
<i>SOX2</i>	Récessif	Oui (parfois)	Non	Oui	Non	Non	Hypoplasie	Normale	Anomalies oculaires, malformations cérébrales, trouble auditif, atrésie œsophagienne
<i>OTX2</i>	Dominant	Oui	Variable	Variable	Variable	Variable	Hypoplasie ou normale	Ectopique ou normale	Anophtalmie, microphthalmie
<i>PITX2</i>	Récessif ou dominant	Oui (rare)	Variable	Variable	Non	non	Normale	Normale	Syndrome d'Axenfeld-Rieger

Les études génétiques, réalisées notamment chez la souris, ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement pituitaire. Dans beaucoup de cas, les gènes découverts chez la souris ont mené à la découverte de mutations chez des patients. Les phénotypes observés chez l'homme peuvent néanmoins varier par rapport à ceux décrits chez la souris.

A ce jour, les mutations identifiées dans les gènes codant pour les facteurs de transcription du développement antéhypophysaire comptent pour une petite proportion de cas d'hypopituitarisme chez l'homme. Cependant, ces mutations ont permis une meilleure compréhension des mécanismes qui mènent à un développement pituitaire normal.

Un déficit hypophysaire est défini comme une insuffisance de synthèse ou de sécrétion d'une ou plusieurs hormones antéhypophysaires. Les mutations identifiées se manifestent par un déficit isolé en hormone de croissance (IGHD ou *Isolated Growth Hormone Deficiency*) ou par un déficit combiné en hormones pituitaires (CPHD ou *Combined Pituitary Hormone Deficiency*). Les déficits hypophysaires multiples associent le plus souvent un déficit somatotrope à un autre déficit antéhypophysaire (le plus souvent gonadotrope et thyrotrope) mais toutes les associations de déficits sont possibles. En plus des déficits hormonaux antéhypophysaires, les mutations des facteurs de transcription exprimés au cours du développement entraînent parfois d'autres anomalies hypophysaires ou extra-pituitaires telles qu'une hypoplasie de l'antéhypophyse, une post-hypophyse ectopique, une dysplasie septo-optique, des anomalies du corps calleux, *etc.* D'une manière générale, une mutation d'un facteur de transcription impliqué précocement au cours du développement, conduit à un phénotype syndromique (association de plusieurs anomalies) (**Tableau 2**).

1.2.1. OTX2

Otx2 est un facteur de transcription exprimé tôt au cours du développement (e9,5) et requis pour la formation de la glande pituitaire ainsi que dans le développement oculaire [Kurokawa et al., 2004].

Chez les souris *Otx2*^{-/-} (recombinaison homologue), les structures antérieures correspondant à la future tête sont absentes [Acampora et al., 1995]. Bien que son rôle dans le développement de la glande pituitaire n'ait pas encore été précisément étudié, sa présence dans les structures antérieures implique qu'il soit nécessaire au développement de la poche de Rathke. Otx2 est également important pour l'expression correcte de Hesx1 [Rhinn et al., 1999].

OTX2 est situé en 14q22.3 et est constitué de cinq exons. Chez l'homme, dix-sept mutations hétérozygotes d'OTX2 ont été identifiées. Ces mutations incluent des délétions du gène entier, douze mutations conduisant à un codon stop précoce et quatre mutations faux-sens. L'effet délétère des mutations faux-sens n'a été étudié que dans le cas de la mutation p.Asn225Ser [Diaczok et al., 2008]. Sept d'entre elles sont associées à un déficit en GH, les dix autres ont été identifiées chez des patients présentant une anophtalmie ou microphthalmie, une antéhypophyse hypoplasique ou normale et une post-hypophyse ectopique ou en place (pour revue [Henderson et al., 2009; Reynaud et al., 2011]).

1.2.2. SOX2 – SOX3

Sox2 et Sox3 sont des facteurs de transcription de la famille SRY (*Sex determining Region on Y-box*) qui possèdent un domaine HMG (*High Mobility Group*). Ils sont co-exprimés dans tous les précurseurs du système nerveux central. Pendant le développement pituitaire, ils sont exprimés dans le diencéphale ventral notamment au niveau de l'infundibulum (Sox3) et de la poche de Rathke (Sox2) [Fauquier et al., 2008; Masui et al., 2007; Rizzoti et al., 2004; Wood et Episkopou, 1999].

Les souris invalidées pour Sox2 meurent rapidement *in utero*. Un tiers des souris hétérozygotes meurent avant ou rapidement après la naissance et une certaine proportion ont une hypoplasie de l'antéhypophyse. Les souris présentent

également des niveaux modérément réduits de Gh et de Lh ce qui suggère l'importance de Sox2 dans le développement pituitaire [Kelberman, 2006].

Sox3 est normalement exprimé dans le diencephale ventral, qui est aussi le lieu d'expression des molécules de signalisation *Bmp4* et *Fgf8* dont la présence est nécessaire à l'induction et la prolifération de la poche de Rathke [Rizzoti et Lovell-Badge, 2007; Rizzoti et al., 2004; Weiss et al., 2003]. Les souris délétées du gène Sox3 présentent une poche de Rathke de morphologie anormale ainsi que des défauts cranio-faciaux. Elles présentent également un hypopituitarisme avec des niveaux diminués en Gh, Lh, Fsh et Tsh [Rizzoti et al., 2004].

SOX2 et SOX3 sont deux facteurs de transcription codés par un exon unique. SOX2 est localisé en 3q26.3-q27. Chez l'homme, les mutations hétérozygotes identifiées sont associées à un déficit gonadotrope parfois associé à un déficit somatotrope, une hypophyse hypoplasique, des anomalies oculaires sévères (anophtalmie, microphthalmie), des anomalies digestives (atrésie de l'œsophage) et des retards du développement génital chez les garçons. A ce jour, 22 mutations hétérozygotes ont été rapportées parmi lesquelles, huit mutations non-sens, dix mutations entraînant un décalage du cadre de lecture et trois mutations faux-sens (pour revue [Kelberman, 2006]). En plus de ces mutations, sept délétions hétérozygotes partielles ou entières de SOX2 ont été décrites ainsi que trois changements hétérozygotes non synonymes identifiés chez des patients qui avaient hérité ces variations de parents sains.

Chez l'homme, SOX2 est exprimé en même temps que *LHX3* et *HESX1* pendant le développement de l'antéhypophyse. Des études *in vitro* ont montré que SOX2 peut se lier à l'ADN par son domaine HMG aux promoteurs *LHX3* et *HESX1* pour activer la transcription, ce qui suggère un rôle régulateur de SOX2 sur LHX3 et/ou HESX1 durant le développement pituitaire [Kelberman et al., 2008; Sajedi et al., 2008; Rajab et al., 2008].

SOX3 est situé sur le chromosome X en q26-27. Ce facteur de transcription est impliqué dans la différenciation sexuelle. Les mutations de SOX3 ont été identifiées chez des patients mâles présentant un IGHD (le déficit en GH est constant) ou un CPHD (ACTH, TSH) associé ou non à un retard mental, une hypoplasie antéhypophysaire, une posthypophyse ectopique ou en place, des anomalies du corps calleux et des défauts cranio-faciaux [Lagerström-Fermér et al.,

1997; Laumonnier et al., 2002; Woods et al., 2005; Alatzoglou et al., 2011]. Les femmes hétérozygotes sont asymptomatiques.

1.2.3. SIX

Les facteurs de transcription de cette famille possèdent un domaine d'interaction protéine-protéine, le domaine SIX ou SD. L'homéodomaine est similaire à celui de la protéine *sine oculi* (*so*) de la drosophile. Cette famille comprend six membres qui peuvent activer ou réprimer la transcription dont quatre sont exprimés au cours du développement de la glande pituitaire (Six1, 3, 4 et 6 [Kawakami et al., 2000]). Leurs rôles sont difficiles à déterminer en raison de la redondance fonctionnelle entre eux (Six1 et Six4) et la sévérité du phénotype affectant la structure du cerveau antérieur chez les souris invalidées pour Six3.

Six6 est exprimé dans la glande pituitaire (e13,5), l'hypothalamus et l'œil [Li et al., 2003; Jean et al., 1999].

Les souris *Six6*^{-/-} possèdent une glande pituitaire hypoplasique et une rétine avec un nombre réduit de cellules terminales différenciées. L'invalidation de *Six1* ou de *Six4* n'affecte pas le développement pituitaire.

Une analyse génétique de ce gène a été réalisée chez des patients présentant un déficit pituitaire, une antéhypophyse hypoplasique et des anomalies oculaires et sera développée dans la partie résultats.

1.2.4. GLI

Gli2 code pour une protéine à cinq motifs en doigts de zinc en tandem. L'expression des trois protéines de la famille Gli est dépendante de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) chez les vertébrés.

Les embryons de souris mutantes *Gli2*^{zfd} dont les exons codant pour les domaines doigts de zinc de la protéine ont été délétés, meurent prématurément et présentent des défauts dans le développement du cerveau, de la moelle épinière, des défauts squelettiques [Mo et al., 1997] et un développement anormal des poumons [Motoyama et al., 1998].

Les sept mutations hétérozygotes de *GLI2* (perte de fonction, ou avec une activité dominant-négatif de *GLI2* (transmission autosomique dominante)), ont été

identifiées chez des patients de phénotype variable. Quatre des sept patients présentent une holoprosencéphalie [Roessler et al., 2003] Chez tous les patients, la fonction de la glande pituitaire est anormale et d'autres anomalies cranio-faciales sont retrouvées. Certains patients présentent une polydactylie, une narine unique ou encore une agénésie partielle du corps calleux [Roessler et al., 2003; França et al., 2010].

1.2.5. PITX1 - PITX2

Pitx1 et Pitx2 sont deux facteurs de transcription à homéodomaine de la famille bicoïde. *Pitx1* est exprimé dès e8,5 dans la plupart des cellules de la poche de Rathke mais aussi dans le territoire présomptif des membres inférieurs [Lamonerie et al., 1996]. Son expression est maintenue dans toutes les cellules de l'antéhypophyse jusqu'à l'âge adulte [Szeto et al., 1996; Lanctot et al., 1999]. *Pitx2* est exprimé dès e8,5 dans les cellules de la poche de Rathke notamment dans les cellules gonadotropes mais aussi dans le mésenchyme périoculaire, l'épithélium mandibulaire, le mésenchyme de l'ébauche des membres et l'ombilic. En revanche, il n'est pas exprimé dans les cellules corticotropes [Suh et al., 2002], contrairement à *Pitx1*. Son expression est maintenue à l'âge adulte [Charles et al., 2005].

Les souris *Pitx1*^{-/-} (délétion de l'exon 2 codant pour l'homéodomaine) présentent des anomalies de la différenciation des cellules thyroïdotes et gonadotropes ainsi que des anomalies du développement des membres inférieurs [Szeto et al., 1996; Lanctot et al., 1999].

La délétion complète de *Pitx2* conduit à une létalité embryonnaire avec un arrêt du développement de la poche de Rathke à e12,5. Les souris homozygotes présentent de nombreuses anomalies notamment des défauts cardiaques, un isomérisme pulmonaire, des anomalies dentaires et surtout une diminution en taille de la glande pituitaire avec une réduction en nombre des cellules pituitaires [Lin et al., 1999; Semina et al., 1996; Gage et Suh, 1999; Kitamura et al., 1999]. Chez les souris hypomorphes (*Pitx2*^{neo/neo}), la lignée gonadotrope des embryons survivants est très affectée et les contingents cellulaires somatotrope et thyroïdote différenciées sont réduits.

Les souris doublement invalidées pour *Pitx1/Pitx2* meurent avant ou juste après la naissance et présentent une hypoplasie antéhypophysaire ainsi que des

anomalies du développement des membres inférieurs et de la latéralisation des viscères. On observe une diminution de la prolifération et une glande pituitaire de taille réduite dans les embryons *Pitx2*^{-/-}, *Pitx1*^{+/-} / *Pitx2*^{+/-} et *Pitx1*^{-/-}*Pitx2*^{neo/neo} (allèle hypomorphe de *Pitx2*) suggérant que Pitx1 et Pitx2 fonctionnent de la même manière pour stimuler la prolifération cellulaire.

Pitx1 et Pitx2 sont nécessaires à l'induction de *Lhx3* [Charles et al., 2005]. Ces facteurs de transcription peuvent reconnaître les mêmes sites de liaison et activer les promoteurs de nombreuses hormones pituitaires incluant α -GSU, TSH β , β LH, β FSH, PRL et GH [Tremblay et al., 2000].

PITX2 est situé en 4q25 et est constitué de huit exons. Chez l'homme, les mutations de *PITX2* sont l'une des causes du syndrome d'Axenfeld-Rieger qui est caractérisé par des défauts de la chambre antérieure de l'œil, une hypoplasie dentaire, une hernie ombilicale et un retard mental [Semina et al., 1996]. Certains patients présentent des anomalies supplémentaires notamment un déficit en hormone de croissance et une selle turcique de petite taille reflétant probablement une hypoplasie antéhypophysaire [Idrees et al., 2006].

1.2.6. HESX1

Hesx1 (ou Rpx pour *Rathke's pouch homeobox*) est un facteur de transcription à homéodomaine PAIRED [Thomas et al., 1995] qui apparaît très précocement au niveau de la poche de Rathke. En effet, son expression est détectée dès e6 dans la plaque neurale. Hesx1 est exprimé jusqu'à e12,5 dans la poche de Rathke puis devient indétectable à e13,5 [Hermesz et al., 1996]. Hesx1 possède deux domaines de répression localisés dans la région N-terminale et l'homéodomaine et agit comme un répresseur transcriptionnel [Sornson et al., 1996; Dasen et al., 2001]. L'expression de Hesx1 est régulée de manière directe ou indirecte par *Lhx3* qui permet le maintien de son expression [Sheng et al., 1996] et par *Prop1* (couplé à la β -caténine) qui le réprime [Olson et al., 2006]. Hesx1 est un facteur de transcription nécessaire à la formation de la glande pituitaire et à la formation du prosencéphale normal [Dattani et Robinson, 2002].

Le modèle d'inactivation murin *Hesx1*^{-/-} a montré des anomalies du développement du prosencéphale dès e9. Les souriceaux *Hesx1*^{-/-} présentent des phénotypes pituitaires variables incluant une hypoplasie des nerfs optiques, une

hypoplasie hypophysaire, des anomalies des bulbes olfactifs, une anophtalmie ou microphthalmie et des anomalies de la ligne médiane (absence de corps calleux ou de septum pellucidum, post-hypophyse ectopique) défini sous le terme de dysplasie septo-optique (ou DSO). Pour certaines souris, l'antéhypophyse et l'hypothalamus ne semblent pas être reliés par la tige pituitaire [Andoniadou et al., 2007; Dattani et al., 1998].

Chez l'homme, le gène *HESX1* est situé sur le chromosome 3 en p21.2 et comporte 4 exons. La première mutation homozygote ségrégeant selon un mode autosomique récessif a été décrite chez deux frères issus d'une union consanguine. Cette mutation située dans l'homéodomaine (R160C) provoque la perte de l'interaction avec l'ADN [Dattani et al., 1998]. Ces patients présentaient un déficit combiné en hormones pituitaires, une dysplasie septo-optique (absence de corps calleux, antéhypophyse hypoplasique, hypoplasie des nerfs optiques) ainsi qu'une post-hypophyse ectopique.

A ce jour, douze des quinze mutations identifiées ont été rapportées comme des mutations causales. Huit d'entre elles sont retrouvées à l'état hétérozygote. La transmission peut être autosomique dominante ou récessive. Deux mutations de *HESX1* ont été mises en évidence au laboratoire, la première a été identifiée à l'état homozygote chez un patient issu d'une union consanguine avec un CPHD, une aplasie de l'antéhypophyse et un colobome [Sobrier et al., 2005]. La seconde mutation a été identifiée chez un patient présentant un CPHD, une aplasie de l'antéhypophyse sans anomalie oculaire [Sobrier et al., 2006]. Les patients porteurs des mutations de *HESX1* présentent un phénotype variable, le déficit somatotrope peut être isolé ou combiné. L'antéhypophyse est hypoplasique dans 80% des cas, la posthypophyse est ectopique ou non visible dans plus de 60% des cas. Des anomalies oculaires sont parfois associées [Kelberman et al., 2009].

1.2.7. Protéines LIM

Les protéines LIM constituent une famille de molécules régulatrices impliquées, de façon générale, dans le contrôle du développement. L'acronyme «LIM» dérive des initiales des trois premières protéines LIM identifiées, à savoir **L**in-11 caractérisée chez le nématode *Caenorhabditis elegans* [Freyd et al., 1990], **I**sl-1 découverte chez le rat (*Rattus Norvegicus*) [Karlsson et al., 1990] et **M**ec-3 identifiée

chez *C. elegans* [Way et Chalfie, 1988]. La diversité trouvée parmi les protéines LIM montre qu'elles ne forment pas une famille fonctionnelle, mais plutôt une famille de protéines aux fonctions variées comportant un domaine structural commun : le domaine LIM qui est un domaine en doigt de zinc. Les deux domaines LIM répétés en tandem sont localisés en N-terminal par rapport à l'homéodomaine et dirigent les interactions protéine-protéine. Ces facteurs de transcription ont ainsi la capacité d'interagir avec de multiples partenaires protéiques et participent à l'assemblage et au maintien des complexes protéiques présents au sein de la cellule permettant ainsi le développement et le maintien de la glande pituitaire, de l'œil et du pancréas [Hobert et Westphal, 2000]. Au moins douze membres de cette famille ont été identifiés dont ceux exprimés dans l'hypophyse, Lhx3, Lhx4 et Lhx2.

1.2.7.1. LHX3

Lhx3 code pour trois isoformes Lhx3a, Lhx3b et M2-Lhx3 [Sloop et al., 2001]. Les isoformes Lhx3a et b diffèrent par leurs extrémités amino terminales. L'isoforme M2-Lhx3 ne possède pas les deux domaines LIM. Même si le rôle précis de chacune de ces isoformes reste mal défini, les tests *in vitro* semblent montrer que l'isoforme Lhx3b est moins active que les deux autres. Le facteur de transcription Lhx3 est exprimé dans la poche de Rathke dès 9,5 jours de développement ainsi que dans les motoneurones, la rétine et la glande pinéale [Zhadanov et al., 1995]. A e16,5, l'ARN messenger de *Lhx3* est exprimé dans toute la poche de Rathke. Son expression est aussi retrouvée à l'âge adulte dans les lobes intermédiaire et antérieur de la glande pituitaire [Sheng et al., 1997].

Les souris *Lhx3*^{-/-} meurent rapidement après la naissance. Ces souris présentent une absence de différenciation des cellules somatotropes, lactotropes, thyrotropes et gonadotropes à l'origine d'une aplasie de l'antéhypophyse et est certainement due à une augmentation de l'apoptose [Zhao et al., 2010; Ellsworth et al., 2008]. Seul le contingent des cellules corticotropes est le siège d'une ébauche de différenciation comme en témoigne la présence d'ARN messenger *Pomc* sur les coupes histologiques de la poche de Rathke des embryons. A la naissance, les souris présentent un déficit en Gh, Prl, Tsh, Fsh et Lh ainsi qu'un déficit en glucocorticoïdes. Chez les souris *Lhx3*^{-/-}, la formation de la poche de Rathke est arrêtée précocement. Ces souris ont un défaut dans le maintien de l'expression de

Hesx1 et l'expression de Pou1f1 n'est pas observée. Les souris hétérozygotes présentent un phénotype normal [Sheng et al., 1996]. Un modèle de souris *Lhx3*^{Cre/Cre} (sous le contrôle du promoteur *LacZ*) existe ; ces souris ont une expression réduite de Lhx3 et les défauts pituitaires sont identiques à ceux retrouvés chez les souris *Lhx3*^{-/-} [Zhao et al., 2006]. Lhx3 est requis pour la survie des progéniteurs précoces et pour les événements de différenciation des cellules endocrines tardives.

Chez l'homme, *LHX3* est situé sur le chromosome 9 en q34.3. Onze défauts moléculaires homozygotes de transmission autosomique récessive ont été rapportés. Les premières mutations identifiées concernaient un patient chez lequel une délétion de 23 pb a été identifiée (la fin de l'exon 3 et les 20 pb de l'intron adjacent) et un patient porteur d'une mutation faux-sens ; ces deux patients étaient issus de deux familles consanguines [Netchine et al., 2000]. D'autres mutations affectant les sites d'épissage ou entraînant un décalage du cadre de lecture menant à un codon stop prématuré ainsi que des délétions complète ou partielle de ce gène ont aussi été rapportées. Tous les patients, issus d'une union consanguine, présentent un CPHD, des anomalies de la rotation du cou (excepté un patient) et six de ces patients ont une surdité rapportée [Bonfig et al., 2011]. Les anomalies de la rotation du cou s'expliquent par l'expression préférentielle, au cours du développement, de *LHX3* dans les motoneurones de la région cervicale [Sobrier et al., 2004].

Deux nouvelles mutations hétérozygotes ont été identifiées récemment au laboratoire. Ces mutations ont la particularité d'avoir été retrouvées chez un même patient issu d'une union non consanguine et font l'objet d'un article sous presse dans *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (« Symptomatic heterozygotes and prenatal diagnoses in a non-consanguineous family with syndromic combined pituitary hormone deficiency resulting from two novel *LHX3* mutations ») (voir Analyse de gènes candidats pour les maladies de la croissance).

1.2.7.2. LHX4

Contrairement à Lhx3, son expression est transitoire dans la poche de Rathke. Lhx4 est exprimé dans le tube neural, les motoneurones en formation, l'hypothalamus et la poche de Rathke. On retrouve son expression dans la poche de

Rathke dès e9,5 puis est restreinte au futur lobe antérieur de la glande pituitaire à e12,5 et est diminué à e15,5 [Sheng et al., 1997].

L'invalidation de *Lhx4* conduit à la mort prématurée des souris après la naissance. Le phénotype pituitaire des souris *Lhx4*^{-/-} est similaire à celui des souris *Lhx3*^{-/-} mais apparaît moins sévère. Il existe une ébauche de différenciation des différents contingents cellulaires antéhypophysaires mais un défaut de prolifération cellulaire entraîne une hypoplasie de l'antéhypophyse. Les souris homozygotes présentent également une selle turcique peu développée. Les souris hétérozygotes apparaissent normales [Sheng et al., 1997].

Les cibles connues de *Lhx4* sont *Pou1f1* [Machinis et Amselem, 2005], *αGsu* [Roberson et al., 1994] et *Tsh* [Pfaeffle et al., 2008].

Lhx3 et *Lhx4* agissent de manière redondante dans la formation définitive de la poche de Rathke. La présence d'un seul allèle *Lhx3* ou *Lhx4* permet la formation d'une ébauche de la poche de Rathke. La double invalidation de *Lhx3* et de *Lhx4* résulte en un phénotype pituitaire plus sévère qu'avec les mutants simples. On observe un arrêt développemental de la glande pituitaire précoce [Sheng et al., 1997; Raetzman et al., 2002].

LHX4 est situé en 1q25.2 et comporte 6 exons. La première mutation hétérozygote rapportée, c.607-1G>C, altère un site d'épissage et a été identifiée chez deux patients d'une même famille présentant un CPHD (GH, TSH, ACTH), une malformation d'Arnold Chiari, une selle turcique peu développée et une antéhypophyse hypoplasique [Machinis et al., 2001].

Depuis, six autres mutations de transmission dominante ont été mises en évidence [Pfaeffle et al., 2008; Tajima et al., 2007; Dateki et al., 2010; Castinetti et al., 2008]. Bien que ces patients présentent tous un déficit multiple, il existe néanmoins une grande variabilité phénotypique en terme de déficit hypophysaire et de morphologie pituitaire.

1.2.7.3. LHX2

Lhx2 est un facteur de transcription qui est impliqué dans le développement pituitaire dès e9,5 et continue à s'exprimer dans le système nerveux central à l'âge adulte [Xu et al., 1993]. L'ARNm de *Lhx2* est exprimé dans le diencéphale ventral en développement de la souris et notamment dans l'infundibulum et le lobe postérieur

de la glande pituitaire. *Lhx2* est impliqué dans le développement des lobes antérieur et intermédiaire de la glande pituitaire [Porter et al., 1997; Xu et al., 1993; Zhao et al., 2010].

Chez la souris, l'inactivation de *Lhx2* conduit à des embryons présentant un cortex cérébral de taille réduite ainsi qu'une absence de la post-hypophyse et du lobe intermédiaire de la glande pituitaire, des défauts dans l'organisation de l'antéhypophyse et une anophtalmie. Les souris *Lhx2*^{-/-} développent aussi une fibrose du foie et l'érythropoïèse est incomplète ce qui entraîne une sévère anémie causant la mort avant la naissance [Porter et al., 1997; Wandzioch et al., 2004].

Une étude génétique de ce gène a été réalisée chez des patients présentant un déficit pituitaire associé à une post-hypophyse ectopique ou non visible et des anomalies oculaires. Cette étude fait l'objet d'un article soumis (« Screening of *LHX2* in patients presenting growth retardation with posterior pituitary and ocular abnormalities »).

1.2.8. PROP1

Prop1 est un facteur de transcription à homéodomaine de la famille PAIRED [Sornson et al., 1996]. *Prop1* est exprimé dès e10 dans la poche de Rathke, son expression est maximale à e12,5 puis décroît jusqu'à s'éteindre à e15,5. Prop1 est impliqué dans le développement des lignées somatotropes, lactotropes, thyrotropes et gonadotropes.

Les souris *Ames* sont un modèle murin spontané qui présentent la mutation S83P entraînant la perte de l'activité de liaison à l'ADN [Sornson et al., 1996]. Ces souris présentent un défaut dans l'activation de *Pou1f1* et un déficit en Gh, Prl, Tsh, et, avec un degré variable, un déficit en Fsh/Lh associé. Elles présentent également une hypophyse hypoplasique et sont infertiles [Gage et al., 1995; Tang et al., 1993].

Prop1 est composée de trois hélices α , un domaine de transactivation en N-terminal et un homéodomaine central. Pour les études fonctionnelles, une séquence palindromique commune aux facteurs de transcription de la famille PAIRED est utilisée. Ces études fonctionnelles ont mis en évidence un double rôle d'activateur et de répresseur transcriptionnel. En effet, Prop1 peut activer ses gènes cibles grâce à son domaine de transactivation situé en C-terminal [Sornson et al., 1996] alors que la partie N-terminale et l'homéodomaine permettent des fonctions de répression

[Showalter et al., 2002]. L'interaction de Prop1 et de la β -caténine sur le promoteur *Pou1f1* active l'expression de Pou1f1 [Olson et al., 2006] tandis que le complexe Prop1/ β -caténine avec leurs co-répresseurs TLE, HDAC et la reptine a une activité répressive sur le promoteur de *Hesx1* [Dasen et al., 2001]. Son extinction est nécessaire car le maintien de son expression conduit à un retard dans la maturation de la lignée gonadotrope et participe à la genèse des tumeurs hypophysaires. De même, la surexpression de Prop1 spécifiquement dans les cellules productrices d' α -GSU résulte en un retard dans la différenciation des cellules gonadotropes, un déficit en gonadotrophine transitoire et un retard de puberté. Ceci suggère que la répression temporelle correcte de Prop1 est non seulement importante pour la détermination des cellules spécifiques de Pou1f1 mais est aussi impliquée directement ou indirectement dans l'établissement des autres lignées pituitaires [Vesper et al., 2006].

Les mutations de PROP1 sont les premières causes d'hypopituitarisme congénital. PROP1 est situé en 5q35.3 et est composé de trois exons. Les premières mutations ont été identifiées en 1998, chez des patients présentant un déficit somato-lactotrope, thyrotrope et gonadotrope [Duquesnoy et al., 1998; Wu et al., 1998]. Depuis, 24 mutations de PROP1 ont été décrites, toutes de transmission autosomique récessive. Un déficit corticotrope est aussi retrouvé chez la moitié des patients. Les mutations rapportées concernent essentiellement des acides aminés situés au niveau de l'homéodomaine de la protéine. La morphologie de la glande pituitaire est variable, parfois au sein d'une même famille : la plupart des patients ont une antéhypophyse hypoplasique ou normale mais elle est aussi parfois hyperplasique. Aucune anomalie extra-pituitaire n'a été rapportée à ce jour.

1.2.9. POU1F1

Ce facteur de transcription de la famille POU (pour **P**it1, **O**ct1 et **U**nc86) aussi appelé Pit1, est détectable tardivement au cours du développement pituitaire à e13,5 et continue à s'exprimer à l'âge adulte [Ingraham et al., 1988]. Pou1f1 est nécessaire à la mise en place ainsi qu'au maintien des lignées somatotropes, lactotropes et thyrotropes permettant ainsi la régulation de l'expression des hormones Gh, Prl et Tsh β .

Il existe deux modèles murins spontanés, les souris *Snell* qui présentent une mutation ponctuelle W261C au niveau de l'homéodomaine (POU_H) et les souris *Jackson* qui présentent un remaniement du gène *Pou1f1* [Li et al., 1990]. Ces souris présentent un phénotype identique : une antéhypophyse hypoplasique avec absence des cellules somatotropes, lactotropes et thyrotropes entraînant un déficit en Gh, Prl et Tsh.

Des éléments de liaison à Pou1f1 sont présents sur la séquence promotrice des gènes codant pour la Gh, la prolactine, la Tsh β , le Ghrhr [Mangalam et al., 1989; Steinfeld et al., 1991; Iguchi et al., 1999] et sur son propre promoteur (activité d'autorégulation) [Chen et al., 1990].

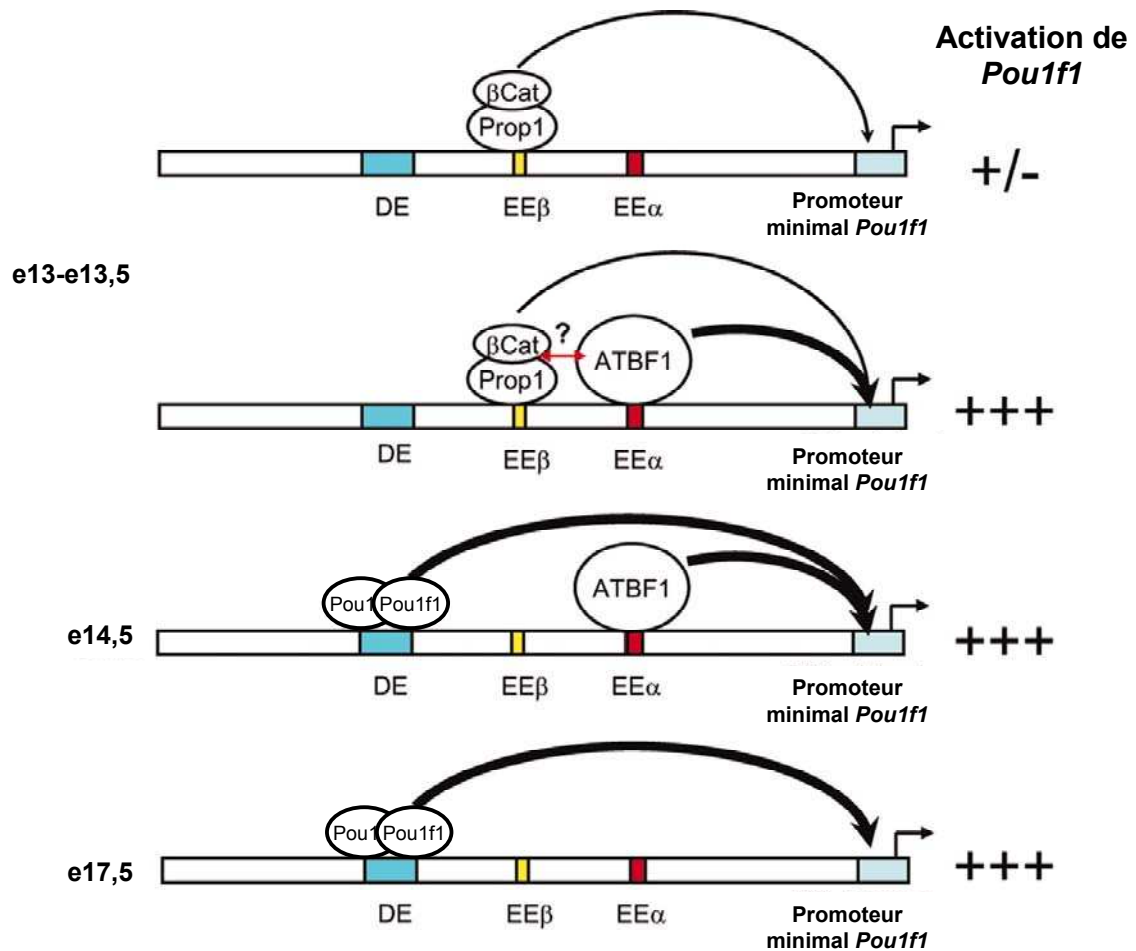


Figure 5 : Modèle d'activation du gène *Pou1f1*. A e13,5, le complexe Prop1/ β -caténine est recruté au niveau de l'enhancer précoce β (EE β) et permet la transcription de *Pou1f1*. Atbf1 est recruté au niveau de l'EE α où il peut potentiellement agir en synergie avec Prop1 (flèche rouge) permettant une augmentation de l'activation de *Pou1f1*. Lorsque *Pou1f1* est exprimé à un niveau suffisant, le complexe Prop1/ β -caténine et Atbf1 n'est plus nécessaire. A e17,5, l'expression d'Atbf1 et de Prop1 est diminuée dans la glande pituitaire et l'expression de *Pou1f1* dépend de *Pou1f1* lui-même sur son enhancer distal (DE). (D'après [Qi et al., 2008]).

L'activation initiale de *Pou1f1* à e13,5 est permise grâce à l'action coopérative de Prop1 et de la β -caténine et est médiée par un enhancer précoce situé entre -5,1 et -10,2 Kb en amont du site d'initiation de la transcription [DiMattia et al., 1997] (**Figure 5**). Pou1f1 est considéré comme une cible directe de Prop1. Cela est basé sur la capacité de Prop1 à transactiver un fragment d'ADN de *Pou1f1* qui contient un enhancer précoce. La présence de Prop1 sur ce site a été démontrée par co-immunoprécipitation à partir d'extraits de glandes pituitaires prélevés dans des embryons de souris à e12,5 et à e13,5 [Olson et al., 2006; Sornson et al., 1996]. Atbf1 est un facteur de transcription contenant de multiples motifs en doigts de zinc. Atbf1 est capable de se lier à l'enhancer précoce de Pou1f1 *in vitro* et *in vivo* et d'activer la transcription de *Pou1f1* [Qi et al., 2008]. A partir de e16,5, le maintien de l'expression de Pou1f1 se fait par une autorégulation grâce à un enhancer distal situé à -10 Kb en amont du site d'initiation de la transcription (**Figure 5**). Cet enhancer distal est composé de trois sites de liaisons à Pou1f1, d'un site de liaison aux récepteurs de la vitamine D et d'un élément de réponse à l'acide rétinoïque ce qui confère une induction par l'acide rétinoïque dépendante de Pou1f1 [Rhodes et al., 1996].

Cependant, le mécanisme d'activation de Pou1f1 pourrait être plus compliqué. Premièrement, chez la souris, il y a un délai d'environ 4 jours entre l'activation de Prop1 et l'expression de Pou1f1 ce qui est inhabituel pour un ciblage direct [Sornson et al., 1996]. Deuxièmement, chez l'homme, les nouveaux nés avec une perte de fonction allélique de PROP1 ont initialement un niveau bas mais biologiquement significatif de TSH, GH et PRL, suggérant que PROP1 n'est pas requis pour l'expression initiale de POU1F1 chez l'homme [Böttner et al., 2004]. De manière similaire, les souris présentant des mutations de *Prop1* expriment des quantités limitées de Pou1f1 et de ses cibles Tsh, Gh et Prl [Gage et al., 1995, 1996]. Cela nécessite d'autres études permettant de clarifier le rôle de Prop1 chez l'homme et chez la souris.

POU1F1, situé en 3p11, est constitué de six exons. Ce gène code pour un facteur de transcription de 291 acides aminés. *POU1F1* est une protéine constituée d'un domaine de transactivation (TAD) situé en N-terminale (acides aminés 11 à 80), et d'un domaine POU. Le domaine POU est un domaine de liaison à l'ADN bipartite composé de 2 sous-domaines : un domaine POU_S (ou POU-spécifique) situé en N-terminal de 75 acides aminés (hélice) et un domaine POU_H (ou POU homéodomaine) de 60 acides aminés (hélice-tour-hélice) situé en C-terminal (**Figure 6**). Les deux domaines POU, séparés par un petit « linker » de 15 acides aminés [Sturm et Herr, 1988; Ryan et Rosenfeld, 1997], sont impliqués dans la liaison de la protéine avec l'ADN, et permettent aussi les interactions protéines-protéines.

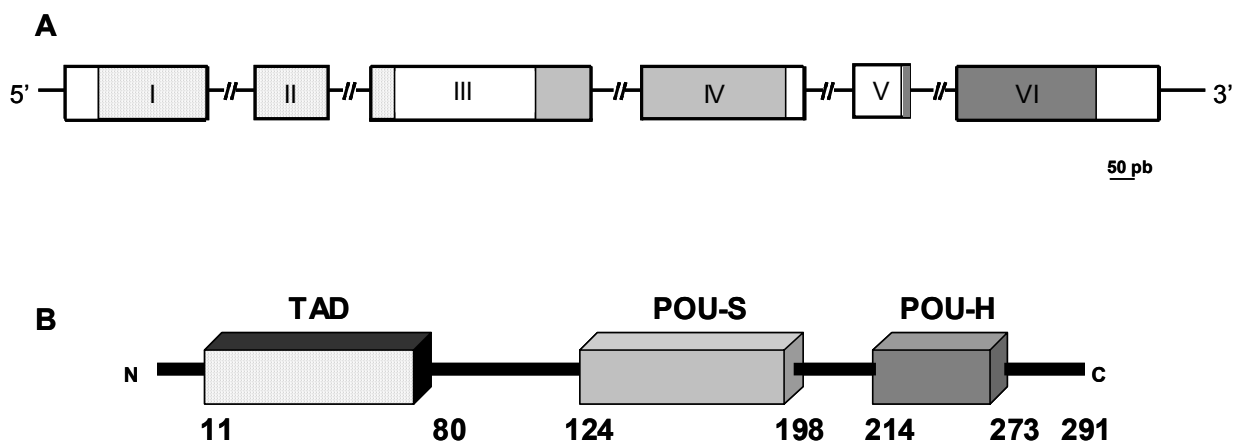


Figure 6 : Représentation schématique du gène *POU1F1* et structure protéique. A, *POU1F1* est composé de 6 exons numérotés de I à VI. B, La protéine de 291 acides aminés est composée du TAD (en pointillé) et de deux domaines POU : POU_S (POU spécifique) et POU_H (POU Homéodomaine) représentés en gris clair et gris foncé respectivement.

Physiologiquement, *POU1F1* est exprimé sous deux isoformes issues d'un épissage alternatif. *POU1F1* β , la forme la moins exprimée (le ratio *POU1F1* β /*POU1F1* est de 1:7), possède 26 acides aminés de plus au sein même du TAD à partir de l'acide aminé 48 (exon 2) [Theill et al., 1992; Morris et al., 1992]. La forme β semble agir comme un répresseur spécifique des gènes cibles *GH*, *PRL* et *TSH* [Jonsen et al., 2009]. Aucune activité répressive n'a été détectée au niveau de son propre promoteur [Ferry et al., 2005; Chen et al., 1990]. On peut donc penser que des mutations au niveau de la séquence du site d'épissage en 3' de l'intron 1 ou

au sein de l'exon 2 pourraient perturber la balance entre les deux isoformes en faveur de la forme β . Ce domaine β est un domaine très conservé au cours de l'évolution et, chez certaines espèces, seule la forme β est existante [Jonsen et al., 2009], ce qui suggère que cette isoforme est la forme précurseur.

Chez l'homme, la première mutation non-sens de *POU1F1* a été identifiée en 1992 chez un patient présentant un CPHD (déficit en GH, PRL et TSH) [Tatsumi et al., 1992]. La majorité des mutations sont de transmission récessive mais quelques mutations hétérozygotes de transmission autosomique dominante ont été rapportées. Le phénotype des patients est relativement homogène. Les déficits GH et PRL sont présents très tôt au cours de la vie, en revanche, le déficit thyroïdote peut apparaître plus tard dans l'enfance ou l'adolescence [Ohta et al., 1992; Pellegrini-Bouiller et al., 1996; Pfäffle et al., 1992]. L'antéhypophyse peut être hypoplasique. Aucune anomalie extra-pituitaire n'a été décrite. A ce jour, 32 mutations ont été identifiées (**Tableau 3** et **Figure 7**), trois de ces mutations sont localisées dans le domaine de transactivation, quatorze sont dans le domaine POU_S , douze dans le domaine POU_H et trois sont localisées dans les introns.

Tableau 3 : Mutations *POU1F1* identifiées chez des patients présentant un déficit combiné en hormones hypophysaires.

Mutation	Type de mutation	Localisation	Mode de transmission	Références
p.Q4X	Non-sens	Exon 1 (TAD)	Récessif	[Salemi et al., 2003]
p.P14L	Faux-sens	Exon 1 (TAD)	Dominant	[Fofanova et al., 1998]
p.P24L	Faux-sens	Exon 1 (TAD)	Dominant	[Ohta et al., 1992]
c. 142+3 A>G	Site d'épissage	Intron 1	Récessif	[Turton et al., 2011]
c.214+1G>T	Décalage du cadre de lecture	Intron 2	Dominant	[Inoue et al., 2011b]
p.F135C	Faux-sens	Exon 3 (POU _S)	Récessif	[Pellegrini-Bouiller et al., 1996]
p.R143Q	Faux-sens	Exon 3 (POU _S)	Récessif	[Ohta et al., 1992]
p.R143L	Faux-sens	Exon 3 (POU _S)	Récessif	[McLennan et al., 2003]
p.K145X	Non-sens	Exon 3 (POU _S)	Récessif	[Hashimoto et al., 2003]
p.A158P	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Wit et al., 1989]
p.Q167K	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Dominant	[Malvagia et al., 2003]
p.T168IfsX7	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Tenenbaum-Rakover et al., 2011]
p.R172Q	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Cohen et al., 1999]
p.R172X	Non-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Tatsumi et al., 1992]
p.E174G	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Brown et al., 1998]
p.S179R	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Miyata et al., 2006]
p.W193R	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Hendriks-Stegeman et al., 2001]
p.W193X	Non-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[Gat-Yablonski et al., 2005]
p.L194Q	Faux-sens	Exon 4 (POU _S)	Récessif	[McLennan et al., 2003]
c.682+1 G>A	Site d'épissage	Intron 4	Récessif	[Snabboon et al., 2008]
p.K216E	Faux-sens	Exon 5	Dominant	[Cohen et al., 1999]
p.E230K	Faux-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Gat-Yablonski et al., 2005]
p.F233L	Faux-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Rainbow et al., 2005]
p.P239S	Faux-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Pernasetti et al., 1998]
c.725_726delAA (p.Q242R)	Décalage du cadre de lecture	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Gat-Yablonski et al., 2005]
c.747delA	Décalage du cadre de lecture	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Hendriks-Stegeman et al., 2001]

Mutation	Type de mutation	Localisation	Mode de transmission	Références
p.E250X	Non-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Irie et al., 1995]
c.778insA	Décalage du cadre de lecture	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Turton et al., 2005]
p.F262L	Faux-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Gat-Yablonski et al., 2005]
p.R265W	Faux-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Turton et al., 2005]
p.R271W	Faux-sens	Exon 6 (POU _H)	Dominant	[Radovick et al., 1992]
p.V272X	Non-sens	Exon 6 (POU _H)	Récessif	[Sheng et Westphal, 1999]

TAD : Domaine de transactivation ; POU_S : POU spécifique, POU_H : POU homédomaine

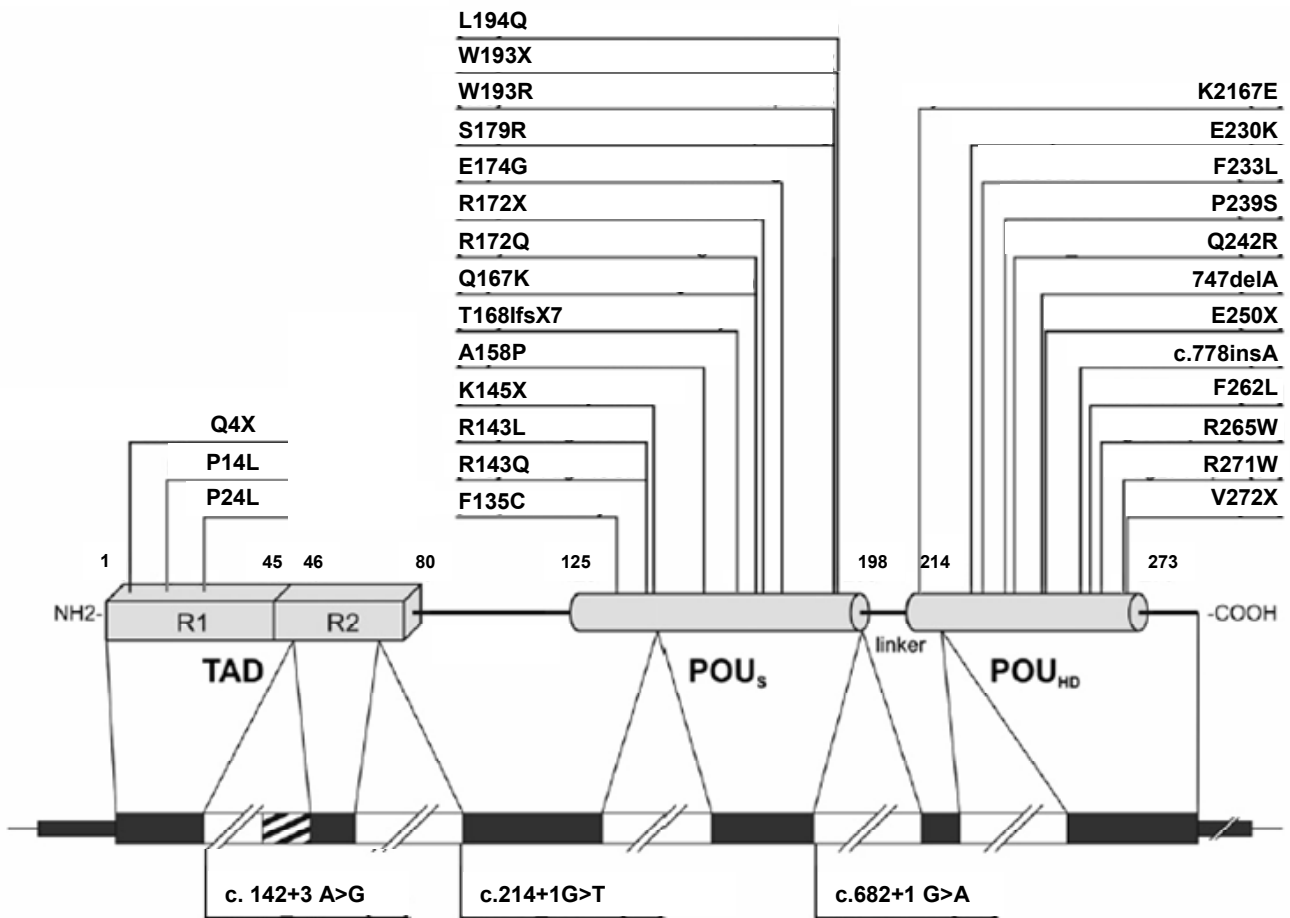


Figure 7 : Organisation génomique et structure de la protéine POU1F1. Les différentes mutations rapportées de POU1F1 sont indiquées. Les exons sont représentés en noir, les introns en blanc et la partie hachurée correspond à la séquence codant pour le domaine β . (D'après [Pfäffle et Klammt, 2011]).

2. Implication des gènes de l'axe somatotrope en pathologie

En plus des mutations au sein des gènes nécessaires au développement de l'hypophyse, des anomalies moléculaires des gènes dont le produit est un élément de l'axe somatotrope peuvent être responsables d'un retard de croissance lié à un déficit en GH ou à un défaut d'activation de la GH. Les mutations des gènes de l'axe somatotrope aboutissent à différents types d'IGHD divisés en quatre classes (IA, IB, II et III, **Tableau 4**) en fonction de la sévérité et du mode de transmission [Cogan et Phillips, 1998].

2.1. *GHRHR*

Une mutation homozygote du gène *Ghrhr* a été identifiée chez la souris *little*. Cette mutation (D60G) entraîne un déficit isolé en hormone de croissance de transmission récessive avec hypoplasie hypophysaire [Lin et al., 1993].

Le GHRHR (*Growth Hormone Releasing Hormone Receptor*) est le récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G de la GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*). La liaison de la GHRH sur son récepteur entraîne une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire ainsi que l'augmentation de la transcription de POU1F1 qui active aussi la transcription du GHRHR [Lin et al., 1992]. Ainsi, POU1F1 et GHRHR autorégulent positivement la sécrétion de GH.

Le gène du *GHRHR*, localisé en 7q15, est constitué de 13 exons. La première mutation homozygote E72X a été identifiée chez deux patients apparentés d'origine indienne. Cette mutation crée une protéine tronquée qui est incapable de lier le GHRH [Wajnrajch et al., 1996]. A ce jour, 17 mutations de transmission autosomique récessive ont été identifiées. Les mutations du *GHRHR* expliquent environ 10% des cas d'IGHD-IB (**Tableau 4**) [Alatzoglou et al., 2009].

Tableau 4 : Classification des différents types d'IGHD

(d'après [Reynaud et al., 2011])

Type	Mode de transmission	Caractéristique	Etiologie
IGHD-IA	Autosomique récessif	Déficit total Développement d'anticorps anti-GH (parfois)	Délétion partielle ou complète de GH Mutation non sens du gène <i>GH</i>
IGHD-IB	Autosomique récessif	Déficit partiel Pas de développement d'anticorps anti-GH	Mutation affectant un site d'épissage (GH) ou mutations non sens (GHRHR)
IGHD-II	Autosomique dominant	Déficit partiel	Mutation faux-sens ou affectant un site d'épissage du gène <i>GH</i>
IGHD-III	Lié à l'X récessif	Déficit partiel +/- agammaglobulinémie	Mutation de <i>SOX3</i>

2.2. *GHSR*

Le *GHSR* (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*) est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G spécifique de la ghréline. La ghréline (28 acides aminés) augmente la synthèse de la GH par une voie indépendante à la voie du GHRH. La ghréline est exprimée dans l'estomac mais également dans l'hypothalamus, dans une région importante pour la régulation de la prise alimentaire [Tolle et al., 2002], ainsi que dans l'hypophyse [Korbonits et al., 2001]. La ghréline est un puissant stimulateur de la sécrétion en GH. Elle agit via son récepteur, le *GHSR*, et permet également de réguler la transcription de *POU1F1*. La ghréline jouerait donc un rôle non seulement dans l'augmentation de la GH mais aussi dans la différenciation des cellules somatotropes [García et al., 2001].

De rares mutations du *GHSR* ont été découvertes chez des patients présentant un déficit partiel en GH ou ayant une petite taille idiopathique [Pantel et al., 2006, 2009; Wang et al., 2004; Inoue et al., 2011a].

2.3. *GH*

Des mutations du gène *GH* ont été identifiées dans environ 12% des cas familiaux et 10% des cas sporadiques d'IGHD [Reynaud et al., 2011].

Dans les cas d'IGHD, le gène *GH* est le plus souvent impliqué. Composé de cinq exons et de quatre introns, il est localisé en 17q23. Le locus *GH* est constitué, chez l'homme, d'un groupe de cinq gènes dans lequel le gène *hGH-N* (en 5') est exprimé exclusivement dans la glande pituitaire. La structure du locus de la GH sera développée dans la partie 3. Régulation de l'expression du gène *GH* humain.

Ces mutations incluent des délétions du gène entier, des mutations faux-sens, non-sens, entraînant un décalage du cadre de lecture ou affectant des sites d'épissage.

2.4. Facteurs de transcription et IGHD

Les phénotypes observés chez les patients sont parfois hétérogènes. Des mutations touchant les gènes *HESX1* et *SOX3* peuvent parfois conduire à des IGHD sans autres déficits associés.

Avant mon arrivée au laboratoire, une nouvelle mutation hétérozygote de *POU1F1* a été identifiée chez un patient suivi par le Pr Bruno Leheup. Cette mutation particulière ségrège parfaitement, de façon surprenante, avec le phénotype d'IGHD des neufs patients d'une même grande famille. L'identification de cette nouvelle mutation de *POU1F1* conduisant à un IGHD, nous a conduit à nous intéresser au mécanisme de la régulation du gène *GH* humain afin de comprendre comment cette mutation altère spécifiquement l'expression de la GH sans que celle de la PRL et de la TSH ne soit touchée.

L'étude fonctionnelle de cette mutation sera développée ultérieurement dans la partie 3.2 Interactions fonctionnelles impliquant POU1F1.

3. Régulation de l'expression du gène *GH* humain

3.1. L'hormone de croissance

La GH existe sous deux formes, 75 à 85% de la GH est un polypeptide de 191 acides aminés (22 KDa) comprenant deux ponts disulfures [Lewis et al., 1980]. Une autre forme minoritaire de 176 acides aminés (20 KDa) est générée après épissage alternatif de l'exon 3 entraînant la perte des acides aminés 32 à 46 [Masuda et al., 1988]. La GH circule sous forme de monomère (principalement) ou sous forme de dimère. Cette hormone peut être liée à la forme soluble de son récepteur, la GHBP (*Growth Hormone Binding Protein*), ce qui permet d'augmenter sa stabilité.

Locus *GH*

La GH est codée par un gène dérivant d'un gène ancestral commun à ceux de la prolactine et de l'hormone lactogène placentaire. Situé sur le chromosome 17 en q22-24, le locus *GH* est composé d'un groupe de cinq gènes ayant tous la même orientation transcriptionnelle et qui possèdent une grande homologie de séquence ce qui est le reflet d'évènements de duplication de ce gène [Hirt et al., 1987]. Parmi ces cinq gènes, deux sont du groupe *GH* (*GH-N* et *GH-V*) et les trois autres sont du groupe de l'hormone chorionique somatomammotrophique (*CS-A*, *CS-B*, *CS-L*) [Miller et Eberhardt, 1983]. Tous ces gènes sont d'expression placentaire, excepté *GH-N* qui est exprimé uniquement dans l'antéhypophyse [Cooke et al., 1988].

Le promoteur du gène *GH-N* possède deux sites de fixation du facteur de transcription POU1F1. En amont de chacun des gènes de ce locus, on retrouve des sites de liaison à POU1F1. Bien que la fonction du promoteur *GH-N* soit dépendante de la liaison de POU1F1 sur ses sites, cette interaction est insuffisante pour l'activation de *GH-N in vivo* [Ingraham et al., 1988; Bodner et Karin, 1987; Lefevre et al., 1987]. En amont de ce gène (-15 Kb par rapport au site d'initiation de la transcription), il a été montré l'existence d'une région non conservée au cours de l'évolution et présente uniquement chez l'homme, appelée *Locus Control Region* ou LCR. Le LCR contient cinq sites d'hypersensibilité à la DNase I (HSI à HSV) [Jones et al., 1995; Jin et al., 2009]. Le site d'hypersensibilité HSIV a été montré comme

étant spécifique de l'expression placentaire des gènes *GH*, les sites HSI et II sont spécifiques de l'expression pituitaire de *GH-N* et les sites HSIII et HSV sont nécessaires à l'expression de *GH* placentaire et pituitaire.

Afin de l'étudier, ce locus *GH* humain comprenant les sites HS a été introduit chez des souris appelées souris hGH/P1. Des expériences de délétions des sites HSI et HSII, sites spécifiques aux cellules pituitaires, ont montré que HSI et HSII sont indispensables à l'expression pituitaire de *GH-N* [Jin et al., 2009; Shewchuk et al., 1999]. En revanche, les souris transgéniques qui ne possèdent que les sites HSI et HSII du LCR présentent des signes de gigantisme avec un niveau extrêmement élevé d'ARNm *GH* et de protéine, alors que la présence du transgène complet hGH/P1 permet d'obtenir une activation normale et physiologique de *GH-N* [Jin et al., 1999; Shewchuk et al., 1999; Jones et al., 1995; Bennani-Baïti et al., 1998]. Ces résultats suggèrent que, même si HSI et HSII sont nécessaires, ils ne sont pas suffisants ; la région complète du LCR est requise pour avoir un niveau d'expression physiologique de *GH-N* [Jones et al., 1995; Bennani-Baïti et al., 1998]. Il a également été montré que les sites HSIII et HSV sont fonctionnels aussi bien dans les tissus placentaires que dans les cellules somatotropes contrairement au site HSIV qui est spécifique du tissu placentaire. Il a été récemment rapporté que HSIII serait en fait ubiquitaire [Kimura et al., 2007].

Des profils d'acétylation des histones et de la méthylation distincts (**Figure 8**) sont associés à l'activation de la chromatine pituitaire ou placentaire [Ho et al., 2004; Kimura et al., 2004]. Les triméthylations de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4-me3) sont souvent associées à une structure active de la chromatine [Gerber et Shilatifard, 2003]. Des triméthylations au locus *GH* ont été montrées dans la région du LCR, notamment au niveau du site HSI, et au niveau du promoteur *GH*. Ceci suggère que l'activation de *GH* se fait via une interaction non linéaire entre ces deux régions. La triméthylation H3K4 à ce même locus est fortement diminuée chez les souris dont le transgène hGH/P1 est délété du site HSI (hGH/P1(Δ HSI)) [Ho et al., 2008].

L'activation du *GH-N* par le LCR est médiée par une modification de l'acétylation des noyaux d'histones. Un domaine de 32 Kb d'hyperacétylation des histones H3/H4 comprenant le LCR a été mis en évidence par immunoprécipitation de la chromatine à partir de glande pituitaire de souris transgéniques hGH/P1 [Elefant et al., 2000; Ho et al., 2002].

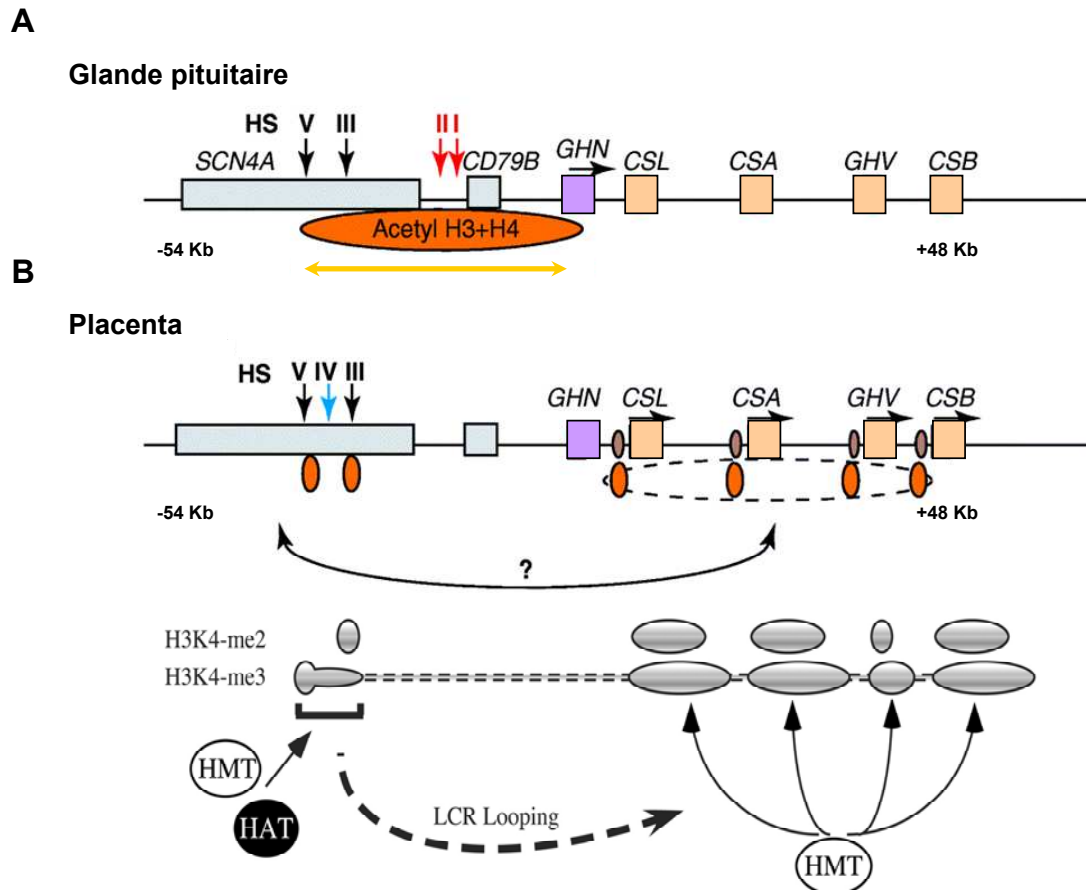


Figure 8 : Profils de méthylation et d'acétylation des histones et activation des gènes au locus *GH* dans la glande pituitaire et dans le placenta. A, Modèle au niveau de la glande pituitaire. Le LCR et les gènes du locus *GH* sont montrés. Le profil d'acétylation des histones H3 et H4 de la chromatine pituitaire est indiqué (en orange). Le LCR et le promoteur *GH* sont compris dans un domaine continu de la chromatine acétylée. La flèche orange indique l'acétylation bidirectionnelle entre les sites HSI et HSV. Les sites HSI et HSII (flèches rouges) sont spécifiques de la glande pituitaire. B, Modèle au niveau placentaire. Le site d'hypersensibilité à la DNaseI spécifique du placenta (HSIV, flèche bleue) et les éléments P (en marron) associés à chaque gène d'expression placentaire sont indiqués. Les éléments P correspondent à une région de 260 pb localisée en 5' de chacun des gènes d'expression placentaire et sont responsables de la répression de l'expression de ces gènes dans la glande pituitaire. Dans ce modèle, les sites HSV et HSIII sont sélectivement acétylés (orange), suivi en 3' par une région hypoacétylée. Des régions acétylées sont également retrouvées au niveau de chaque élément P. Une boucle hypothétique entre le LCR et les gènes spécifiques du placenta (double flèche noire) pourrait expliquer l'activation transcriptionnelle de ces gènes. Les sous-domaines définis par la diméthylation H3K4 (H3K4-me2) sont limités à la proximité immédiate des quatre gènes placentaires et excluent les éléments P. La répartition de la triméthylation H3K4 (H3K4-me3) définit des sous-

domaines plus larges qui sont dans la région 3' flanquante de ces gènes. La région de 28 Kb entre le LCR placentaire et le groupe de gènes placentaires est peu méthylée (double lignes en pointillés).

Les rectangles bleus clairs correspondent aux gènes SCN4A (canal calcique spécifique du muscle squelettique) et CD79B (sous unité Ig β du récepteur des lymphocytes B).

GH : hormone de croissance ; HAT : histone acetyltransferase ; HS : hypersensitive site ; LCR : locus control region.

(Adapté de [Ho et al., 2004; Kimura et al., 2004])

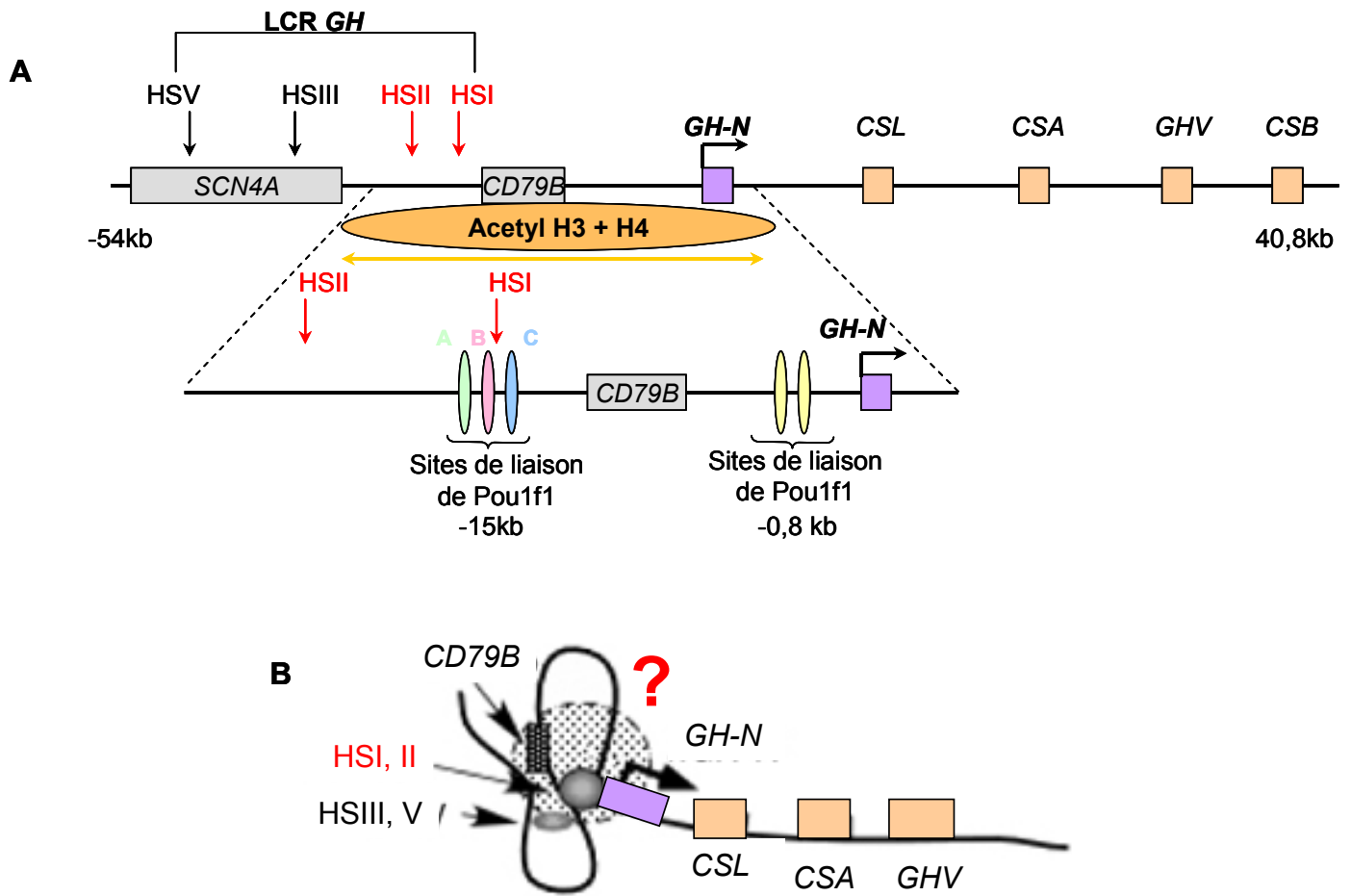


Figure 9 : Modèle d'activation du gène *GH* humain. A, Représentation schématique de la région 17q22 comprenant le locus *GH* humain. Cette région est composée d'un groupe de cinq gènes (représentés en violet et en orange). Les gènes *CD79B* (exprimé dans les lymphocytes B) et *SCN4A* (spécifique des muscles striés) sont également retrouvés dans la région du locus *GH*. Tous ces gènes sont transcrits dans la même orientation. Les quatre sites d'hypersensibilité à la DNase I (HS) pituitaires qui constituent le LCR (*Locus Control Region*) sont indiqués par des flèches. Les sites HSI et HSII sont des sites spécifiques à la glande pituitaire chez l'adulte (représentés en rouge). On retrouve deux sites de liaison à POU1F1 au niveau du promoteur *GH* et trois au niveau du site HSI. B, Modèle de la boucle d'activation spécifique de *GH-N*. Le modèle actuel d'activation comprend l'acétylation des histones H3-H4, la transcription de petits ARN, la réorganisation de la chromatine, la formation d'une boucle permettant la transcription du gène *GH*. La composition du complexe protéique formé n'est pas encore connue (D'après [Ho et al., 2004; Shewchuk et al., 2006; Ho et al., 2008, 2011]).

Un pic d'acétylation est observé dans une région qui coïncide avec HSI et s'étend en 5' jusqu'à HSV et en 3' vers *GH-N*. Cette distribution suggère que les déterminants de cette région sont impliqués dans le recrutement de co-facteurs d'histone acétyltransférase (HAT) au niveau du locus *GH*. La délétion du site HSI a montré une perte de l'acétylation au niveau de ce locus [Ho et al., 2002].

Une étude a montré, à partir d'ARN de glande pituitaire de souris hGH/P1, qu'un niveau important de transcrits était détecté dans la région comprise entre -21 Kb du site d'initiation de la transcription de la GH et le gène *CD79B* (gène codant pour la sous unité Ig β du récepteur des lymphocytes B). Le niveau de transcrits diminue ensuite brusquement après *CD79B*, puis est augmenté au niveau de *GH-N*. Lorsque le site HSI est délété, les transcrits de la région LCR-*CD79B* ne sont plus détectables. Ces données montrent la présence de petits ARN, spécifiques de la glande pituitaire et dépendants de HSI, dans la région LCR-*CD79B* [Ho et al., 2006].

Au niveau du site HSI, il existe une région de 404 paires de bases contenant une succession de trois sites de liaison à POU1F1 (appelés sites A, B et C) [Shewchuk et al., 1999] (**Figure 9A**). Ces trois sites de liaisons sont non seulement importants pour l'expression de *GH-N* dans les cellules somatotropes [Shewchuk et al., 2006] mais sont aussi nécessaires pour l'exclusion de l'expression de *GH-N* dans les cellules lactotropes et thyroïdotropes [Ho et al., 2011]. L'élimination de deux de ces trois sites dans les souris transgéniques conduit à une diminution drastique de l'expression de *GH-N* (diminution supérieure à 95%) [Ho et al., 2002]. Ce site HSI semble donc avoir un double rôle : cibler la modification des histones et activer l'expression de *GH-N* spécifiquement dans les cellules somatotropes ; HSI est donc un élément central dans le contrôle du locus *GH* chez l'homme [Shewchuk et al., 2002].

La présence au niveau du LCR *GH* de *CD79B* entre HSI et le promoteur *GH* augmente la complexité de compréhension du fonctionnement du cluster *GH* [Bennani-Baïti et al., 1998], tout comme la localisation des sites HSIII et HSV qui se situent au sein même d'une séquence intronique du gène *SCN4A* qui code pour un canal calcique spécifique du muscle strié squelettique. Le modèle actuel du fonctionnement de la transcription du gène *GH* comporte plusieurs étapes : l'acétylation des histones H3/H4, la synthèse de petits ARN dans la région *CD79B*-LCR, la réorganisation de la chromatine permettant la formation d'une boucle rapprochant ainsi les sites HSI et HSII du promoteur *GH*. Toutes ces étapes

permettant d'aboutir à la transcription du gène *GH* [Ho et al., 2008] (**Figure 9A et B**). Cependant, la chronologie de la fixation de POU1F1 sur ses sites de liaison ainsi que les protéines partenaires intervenant dans ce complexe ne sont pas encore connues à ce jour.

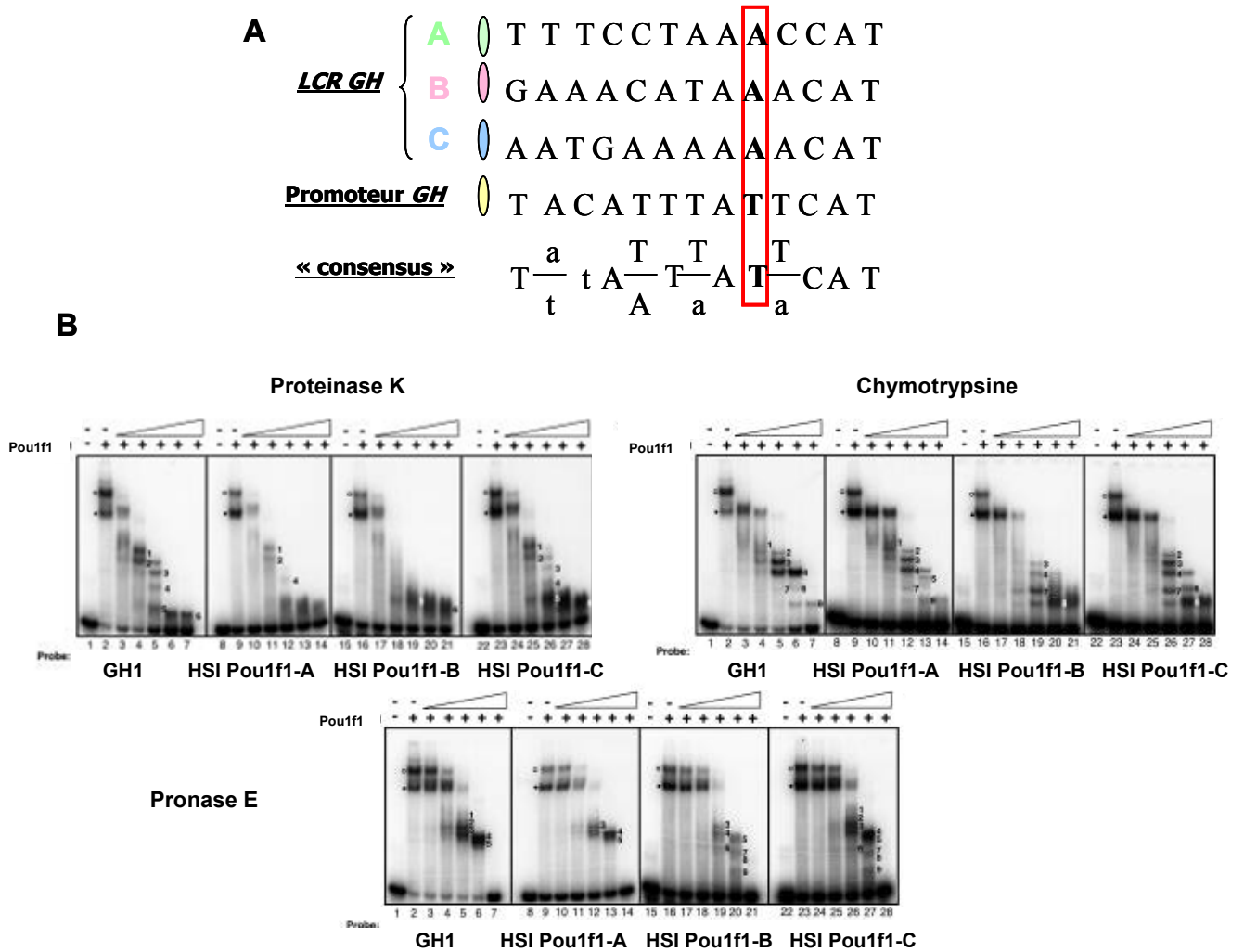


Figure 10 : Les conformations des complexes POU1F1 sont déterminées par les séquences des sites de liaison. A, La séquence consensus établie à partir des sites de liaison POU1F1 identifiés sur *GH*, *PRL*, *TSHβ* et *POU1F1* est indiquée. Les bases A et T qui distinguent les sites A, B et C du LCR et la séquence consensus déterminée sont encadrées. B, Des expériences de digestion limitée (PCBA : *Proteolytic Clipping Bandshift Assay*) sont réalisées avec trois enzymes différentes : la protéinase K (à gauche), la chymotrypsine (à droite) et la pronase E (en bas). L'absence ou la présence de protéase (absence, signe moins; présence, triangle rectangle) et de la protéine Pou1f1 recombinante purifiée (absence, signe moins; présence, signe plus) est indiquée au-dessus de chaque autoradiogramme. La bande indiquée par un point noir dans le premier puits contenant Pou1f1 correspond au complexe sonde/dimère Pou1f1. Les produits protéolytiques majeurs sont numérotés à droite des bandes correspondantes. On note que l'accessibilité aux protéases est modifiée en fonction du site de liaison suggérant que POU1F1 prend une conformation différente en fonction de son site de liaison (D'après [Ho et al., 2004; Shewchuk et al., 2006; Ho et al., 2008]).

La comparaison des séquences ADN des sites de liaison de POU1F1 d'une série de promoteurs *GH* (humain, souris et rat) mais aussi de promoteurs possédant des sites de liaison POU1F1 (*PRL*, *TSH*, *POU1F1*) à celles des sites présents au niveau de HSI, a montré qu'une base T très conservée parmi tous les sites POU1F1 des promoteurs était remplacée par un A dans les trois sites retrouvés au niveau HSI (**Figure 10A**). Cette différence d'une base suggère que POU1F1 pourrait se lier différemment sur les sites HSI et sur le promoteur *GH* [Ho et al., 2004]. Des expériences de digestions trypsiques, réalisées avec trois enzymes, ont effectivement montré, *in vitro*, des profils différents en fonction des sites de liaison étudiés, suggérant que POU1F1 prendrait une conformation particulière en fonction de son site de liaison et notamment en fonction de la présence de la base A ou T dans la séquence [Shewchuk et al., 2006] (**Figure 10B**).

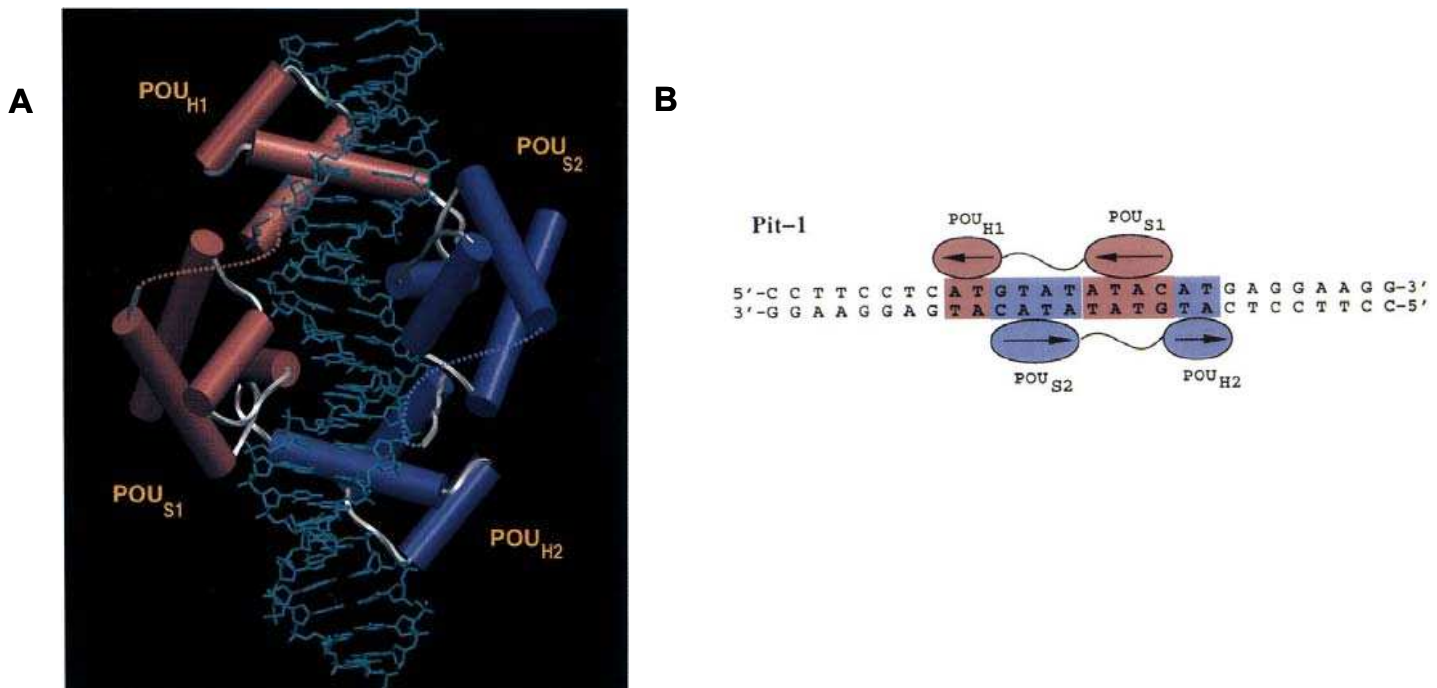


Figure 11 : Structure tridimensionnelle du complexe ADN - domaines POUH et POUH de la protéine POU1F1 et modèle d'interaction des domaines POU avec l'ADN. A, Représentation du complexe ADN-protéines POU1F1. Les lignes en pointillés montrent les liens flexibles putatifs connectant les domaines POU-spécifiques (POUS1 et POUS2) avec les domaines POU homéodomaines (POUH1 et POUH2). B, Les domaines POU de POU1F1 se lient à l'ADN en homodimère. Les flèches indiquent l'orientation de la fixation montrant que les protéines POU1F1 se lient «tête-bêche» [Jacobson et al., 1997].

3.2. Interactions fonctionnelles impliquant POU1F1

Les analyses de cristallographie des domaines POU de POU1F1 ont montré que POU1F1 s'homodimérise de manière « tête-bêche » sur l'ADN afin de permettre une liaison optimale sur sa séquence palindromique de reconnaissance (**Figure 11**) [Jacobson et al., 1997]. Le « linker » de 15 acides aminés, situé entre les deux domaines POU, a un rôle important puisqu'il permet une flexibilité entre les points de contact ADN-protéines et ainsi une régulation de la structure de la protéine. Les domaines POU sont également impliqués dans des interactions avec différents partenaires de POU1F1 comme le domaine de transactivation. Les interactions POU1F1 avec ses différents partenaires sont présentées dans la **Figure 12** et détaillées ci-dessous.

Le TAD contient une région de régulation basale R1 (acides aminés 1 à 45) et une région responsable de la réponse Ras, R2 (acides aminés 46 à 80). La délétion de la région R1 diminue l'activité basale de Pou1f1 tandis que la délétion de la région R2 bloque la capacité de Pou1f1 à stimuler la réponse du promoteur *Prl* de rat par Pou1f1 et le facteur de transcription Ets1 dans des cellules GH4 (cellules pituitaires murines). Ceci suggère que le domaine R2 se lie à des co-facteurs transcriptionnels qui régulent la signalisation Ras [Duval et al., 2003]. Dans le domaine R2, des motifs ont été identifiés et sont critiques pour l'interaction synergique avec des co-facteurs transcriptionnels. Ces motifs contiennent trois résidus tyrosine séparés par six acides aminés (Y6Y6Y), localisés entre les acides aminés 48 et 72 [Duval et al., 2007]. Bradford et al. ont également montré que Ets1 pouvait interagir physiologiquement et physiquement avec l'homéodomaine de Pou1f1 sur le promoteur *Prl* de rat dans les cellules HeLa (cellules tumorales humaines). Des analyses de liaison de Ets1 à différents domaines de Pou1f1 fusionnés à la GST montrent que la délétion de l'homéodomaine de Pou1f1 entraîne une diminution significative de la liaison à Ets1 [Bradford et al., 2000].

Dans les cellules CV-1 (cellules rénales de singe), l'activation basale du promoteur *Prl* de rat par Pou1f1 est conservée en l'absence des acides aminés 45 à 72 de Pou1f1 (domaine R2). La délétion de ce même domaine de Pou1f1 altère la synergie Pou1f1 avec le récepteur aux œstrogènes. Des expériences de substitutions des résidus tyrosine en alanine du motif Y6Y6Y ont également montré

une abolition complète de la synergie Pou1f1 avec le récepteur aux œstrogènes sur le promoteur *Prl* [Holloway et al., 1995]. En revanche, la synergie Pou1f1/récepteurs aux œstrogènes est dépendante du promoteur puisque les récepteurs aux œstrogènes interagissent avec le domaine R1 du TAD de Pou1f1 pour l'activation de *Gh* [Holloway et al., 1995].

Dans les cellules U937 (cellules monocytaires humaines) ainsi que dans les cellules GHFT1 (cellules pituitaires murines), il a été montré que l'activation du promoteur *Gh* de rat était augmenté par l'action synergique de Pou1f1 de rat et de TR humain (récepteur des hormones thyroïdiennes) par rapport à la transfection seule de Pou1f1 ou de TR [Schaufele et al., 1992]. Des analyses complémentaires, par délétion de différents domaines de Pou1f1 et de TR, ont montré que les acides aminés 72 à 100 (région contenant cinq prolines) de Pou1f1, comprenant le domaine R2 du TAD, était nécessaire à l'action synergique de cette protéine avec TR au niveau du promoteur *Gh* dans les cellules U937 et GHFT1 [Chang et al., 1996].

Bien que la synergie Pou1f1/Zn-15 (protéine membre de la superfamille des facteurs de transcription à doigt de zinc) observée sur le promoteur *Gh* de rat en cellules CV-1, soit attribuée au TAD, les expériences menées lors de cette étude ne permettent pas de définir plus précisément le domaine interagissant avec Zn-15 [Lipkin et al., 1993]. De plus, sur ce même promoteur, en présence de Zn-15 et de la mutation POU1F1 p.Pro158Ala [Pfäffle et al., 1992], la synergie n'est plus observée, suggérant peut être un rôle du domaine POU_S dans l'interaction de Pou1f1 avec Zn-15 [Lipkin et al., 1993]. De même, Pitx1 et Pou1f1 interagissent par l'intermédiaire du domaine de transactivation de Pou1f1 et de la partie C-terminale de Pitx1. Cette interaction résulte en une activation synergique sur les promoteurs *Gh* et *Prl* de souris dans les cellules CV-1 et HeLa [Szeto et al., 1996; Tremblay et al., 1998].

En cellules CV-1, la synergie de Pou1f1 de souris avec GATA2 humain a également été montrée sur le promoteur murin *Tshβ* [Gordon et al., 1997]. Des expériences de GST pull-down montrent que l'interaction Pou1f1/GATA2 était perdue lorsque les acides aminés 209 à 291 (POU_H) de Pou1f1 étaient délétés. Cependant, des expériences de délétions de différentes régions de Pou1f1, en présence de GATA2, ont montré que bien que l'activation du promoteur *Tshβ* soit fortement réduite en absence des domaines POU (POU_S et POU_H), d'autres domaines de Pou1f1, notamment la région comprenant les acides aminés 72 à 125, étaient importants pour l'interaction de Pou1f1 avec GATA2. Ces résultats suggèrent que

différents domaines de la protéine Pou1f1, incluant le TAD, POU_S et POU_H, sont requis pour la synergie avec GATA2 sur le promoteur *Tshβ* de rat [Gordon et al., 2002].

CBP a été montré comme étant un co-activateur de POU1F1 pour l'expression de ses gènes cibles [Xu et al., 1998]. L'activation du promoteur *Prl* de rat en cellules COS-7 (cellules épithéliales rénales de singe) est fortement augmentée par l'action synergique de POU1F1 et de CBP/p300. L'activation de la *Prl* est fortement diminuée lors de la co-transfection de CBP/p300 et de POU1F1 p.Pro24Leu [Ohta et al., 1992]. Cette activation n'est pas significativement diminuée lorsque l'on compare l'activation de la *Prl* par POU1F1 normale par rapport à POU1F1 p.Pro24Leu. Ces résultats suggèrent un rôle important du TAD de POU1F1 dans le recrutement de CBP/p300 [Kishimoto et al., 2002]. Lors de cette étude, le rôle des domaines POU de POU1F1 n'avait pas été étudié. Cohen et al. ont cependant montré par des expériences de GST pull-down que bien que les mutations p.Phe135Cys [Pellegrini-Bouiller et al., 1996], p.Arg143Gln [Ohta et al., 1992], Ala158Pro [Wit et al., 1989] et Arg271Trp [Radovick et al., 1992] de POU1F1 ne montraient pas de perte d'interaction avec CBP, la mutation POU1F1 p.Lys216Glu [Cohen et al., 1999] montre que l'interaction avec CBP est fortement diminuée suggérant l'importance du domaine POU_H dans l'interaction avec CBP/p300 [Cohen et al., 2006].

Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence la liaison spécifique de POU1F1 avec N-CoR (*nuclear receptor co-repressor*) et plus spécifiquement des domaines POU [Xu et al., 1998]. En cellules GH4C1, les hétérodimères TR/RXR et RAR/RXR (récepteurs de l'acide rétinoïque) se lient au niveau du promoteur *Gh* de rat à proximité des sites de liaison de Pou1f1. L'hypothèse d'une liaison directe entre Pou1f1 et ces récepteurs a été confirmée par des études de liaison *in vitro* avec des protéines fusionnées à la GST. Ces expériences ont permis de démontrer l'existence d'une forte liaison de Pou1f1 avec RXR et une interaction plus faible avec TR et RAR [Palomino et al., 1998].

En présence de vitamine D, la synergie de Pou1f1/VDR (récepteur de la vitamine D) a également été observée en cellules GH3 (cellules pituitaires murines) et HeLa sur le promoteur *Prl* de rat. L'interaction directe de Pou1f1 avec VDR a été démontrée par des expériences de GST pull-down. La délétion de POU_H, mais pas des autres domaines de Pou1f1, abolit la capacité de Pou1f1 à interagir avec VDR [Castillo et al., 1999]. La protéine C/EBPα (*CCAAT/Enhancer Binding Protein α*)

interagit avec Pou1f1 sur le promoteur *Prl* de rat en cellules GHFT1 et HeLa [Demarco et al., 2006] et sur le promoteur *Gh* de rat en cellules U937 [Schaufele, 1996]. Les expériences de co-immunoprécipitation montrent une interaction directe entre Pou1f1 et C/EBP α . Cette interaction est abolie en présence de la protéine POU1F1 p.Phe135Cys mais est conservée en présence de la mutation p.Trp261Cys (mutation causant le phénotype des souris *Snell* [Li et al., 1990]) suggérant un rôle important du domaine POU_S [Demarco et al., 2006].

Les études de synergie Lhx3-Pou1f1 ont montré que la délétion des domaines POU_S ou POU_H de Pou1f1 empêche l'interaction avec la protéine Lhx3 [Bach et al., 1995].

Lsd1 (*Histone Lysine Demethylase*) est nécessaire à la détermination et à la différenciation des différentes lignées pituitaires. En effet, la délétion de *Lsd1* chez la souris, entraîne la perte des marqueurs de différenciation terminale dans les lignées cellulaires dépendantes de Pou1f1 (*Gh*, *Prl*, *Tsh*). Des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules pituitaires ont révélé une interaction entre Lsd1 et Pou1f1 et ont également permis de montrer que Lsd1 est recruté au niveaux de différents promoteurs pituitaires (*Prl*, *Tsh* et *Pou1f1*) [Wang et al., 2007].

POU1F1 est exprimé dans chacun des trois contingents cellulaires synthétisant la GH, la PRL et la TSH β , cependant, chaque type cellulaire synthétise une hormone unique. Chez l'homme, la présence du LCR et notamment des sites de liaison à POU1F1 au niveau de HSI permet à la GH d'être exprimée spécifiquement dans les cellules somatotropes (voir 3.1 L'hormone de croissance). Cependant, le LCR n'étant pas présent chez les autres espèces, d'autres mécanismes sont nécessaires à l'expression spécifique. La configuration de POU1F1 sur ses sites spécifiques ainsi que l'action des autres facteurs liés à l'ADN ou recrutés par POU1F1 permettraient l'assemblage d'un complexe qui dicte l'état d'activation ou de répression de la transcription de *GH* en fonction du type cellulaire. En effet, une étude, réalisée par l'équipe de Rosenfeld, a montré que l'espace entre les sites de fixation de Pou1f1 sur le promoteur *Prl* était de 4 paires de bases alors qu'il était de 6 paires de bases au niveau du promoteur *Gh* ce qui permettrait une activation de la transcription de *Gh* dans les cellules somatotropes alors qu'elle serait réprimée dans les cellules lactotropes [Scully et al., 2000]. Ceci suggère une « communication » entre le TAD et les domaines POU en fonction de la séquence de liaison à l'ADN. Pou1f1 recruterait sélectivement N-CoR dans les cellules dans lesquelles la Gh n'est pas synthétisée, N-CoR agissant ainsi comme un co-répresseur, en revanche, au niveau du promoteur *Gh*, Pou1f1 recruterait TR (récepteur des hormones thyroïdiennes) comme co-activateur de la transcription de *Gh*.

POU1F1 est une protéine dont deux de ses acides aminés peuvent être phosphorylés en réponse à l'AMPc et aux phorbol esters : la sérine 115 et la thréonine 220 [Kapiloff et al., 1991]. L'état de phosphorylation des acides aminés de POU1F1 peut également jouer un rôle dans les interactions protéine-protéine. L'état de phosphorylation de POU1F1 pourrait réguler l'interaction de Ets1 avec POU1F1 au niveau du promoteur *PRL* [Augustijn et al., 2002].

Les études menées jusqu'à ce jour, ont permis de mettre en évidence des co-facteurs de POU1F1. Cependant, peu d'entre eux sont liés à l'activation du gène *GH*. De plus, les modèles murins utilisés ne permettent pas d'identifier les partenaires de POU1F1 spécifique du LCR *GH* présent au niveau du locus humain. Les différents acteurs qui permettent la transcription du gène *GH* restent encore à être identifier.

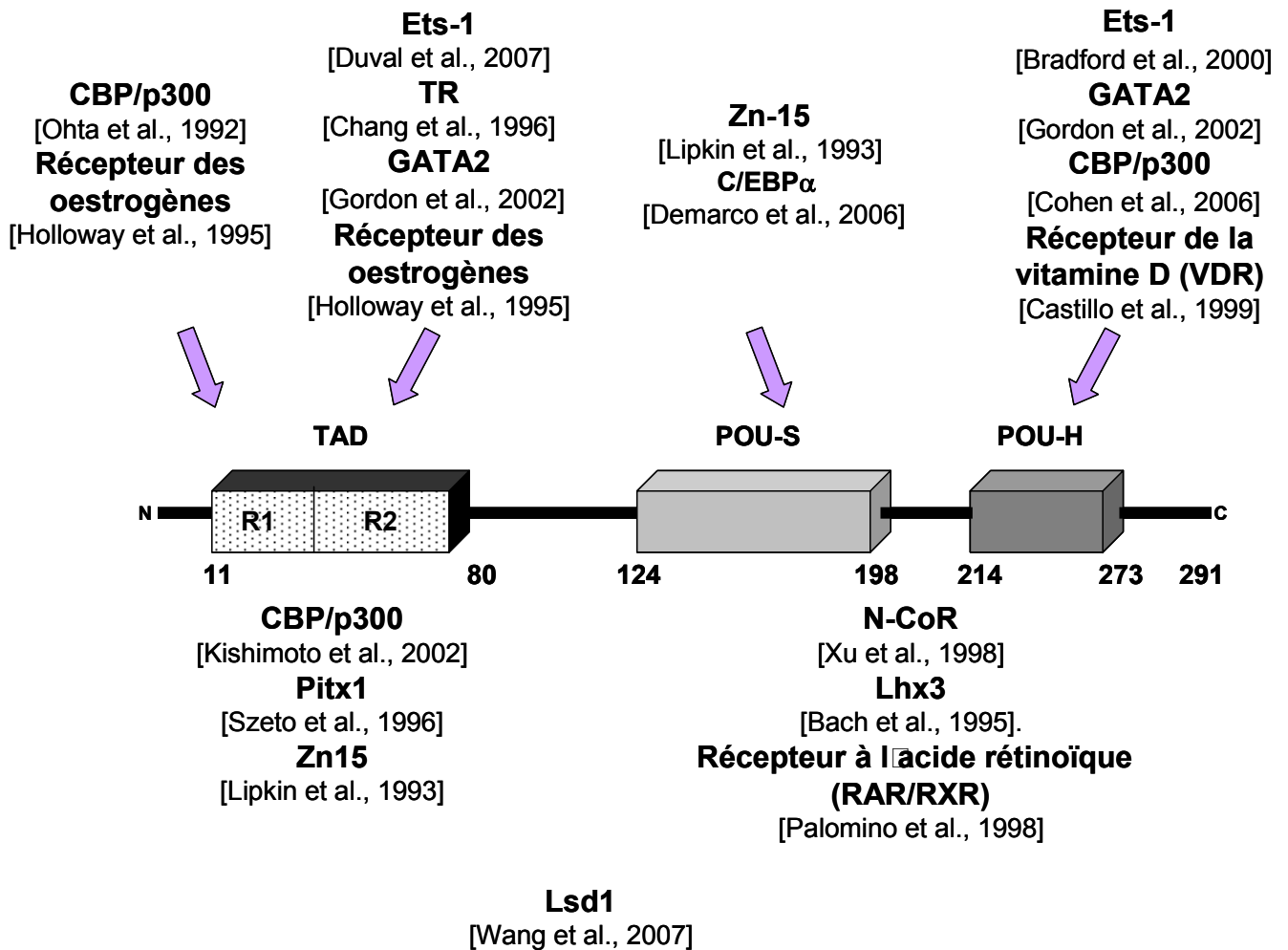


Figure 12 : Co-facteurs de POU1F1. Les partenaires de POU1F1 peuvent interagir avec le TAD ou avec les domaines POU_S et POU_H. CBP/p300, PITX1 et Zn15 interagissent avec POU1F1 sur le TAD mais la région d'interaction n'a pas été précisément définie. Le domaine POU responsable de la liaison aux protéines N-CoR, LHX3 et les récepteurs à l'acide rétinoïque n'a pas été déterminée. La protéine LSD1 est également un partenaire protéique de POU1F1, son domaine d'interaction précis n'est pas connu.

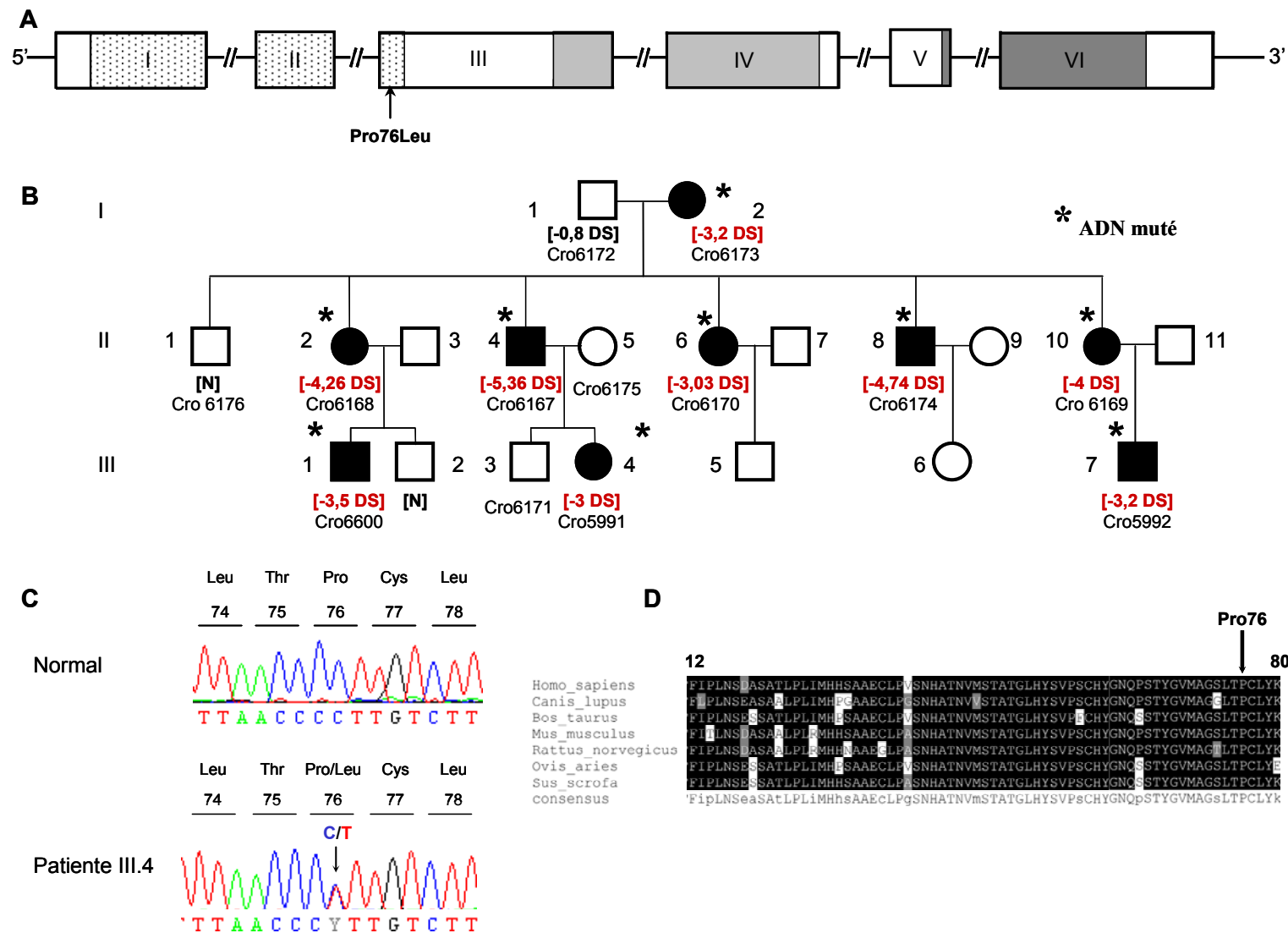


Figure 13 : Variation faux-sens *POU1F1* p.Pro76Leu identifiée chez plusieurs membres de la même famille présentant un déficit isolé en hormone de croissance. A, Schéma du gène *POU1F1* sur lequel est indiqué la position de l'acide aminé 76. Les domaines de transactivation (en pointillés), POU_S (gris clair) et POU_H (gris foncé) sont indiqués. B, Arbre généalogique de la famille, neuf membres de cette famille portent la mutation à l'état hétérozygote. C, Séquences nucléotidiques des allèles *POU1F1* normal (en haut) et muté (en bas). La proline 76 est remplacée par une leucine. D, L'alignement interspèce du domaine de transactivation montre que la proline 76 est invariante au cours de l'évolution.

POU1F1 p.Pro76Leu, une mutation particulière

Avant mon arrivée au laboratoire, une nouvelle mutation de *POU1F1* a été identifiée. Cette mutation hétérozygote ségrège parfaitement avec le phénotype et est retrouvée chez les neufs patients appartenant à la même grande famille suivie par le Pr Bruno Leheup (Centre Hospitalier régional de Nancy) (**Figure 13B et C**). Cette mutation entraîne chez ces patients un phénotype très particulier : un IGHD avec un retard de croissance important (-3 à -5,4 DS). Les IRM réalisées ont montré une antéhypophyse normale ou hypoplasique, une post-hypophyse et une tige pituitaire normales. L'interprétation des dosages biologiques est résumée dans le **tableau 5**. *POU1F1* étant impliqué dans l'expression et la régulation des trois hormones GH, PRL et TSH β , le phénotype attendu correspond à un déficit combiné comme cela a été observé chez les modèles murins mais aussi en pathologie humaine (**Tableau 3**). La proline 76, conservée au cours de l'évolution (**Figure 13D**) et située dans le domaine R2 du TAD, est substitué en leucine.

Tableau 5 : Dosage hormonaux réalisés chez les patients de la famille porteurs de la mutation POU1F1 p.Pro76Leu.

	GH	TSH	Prolactine
I2	Non dosé	Normal	Lactation insuffisante
II2	Déficit	Normal	Normale
II4	Déficit	Normal	Non dosé
II6	Déficit	Normal	Normale
II7	Déficit	Normal	Non dosé
II9	Déficit	Normal	Normale
III1	Déficit	Normal	Normale
III4	Déficit	Normal	Normale
III7	Déficit	Normal	Déficit

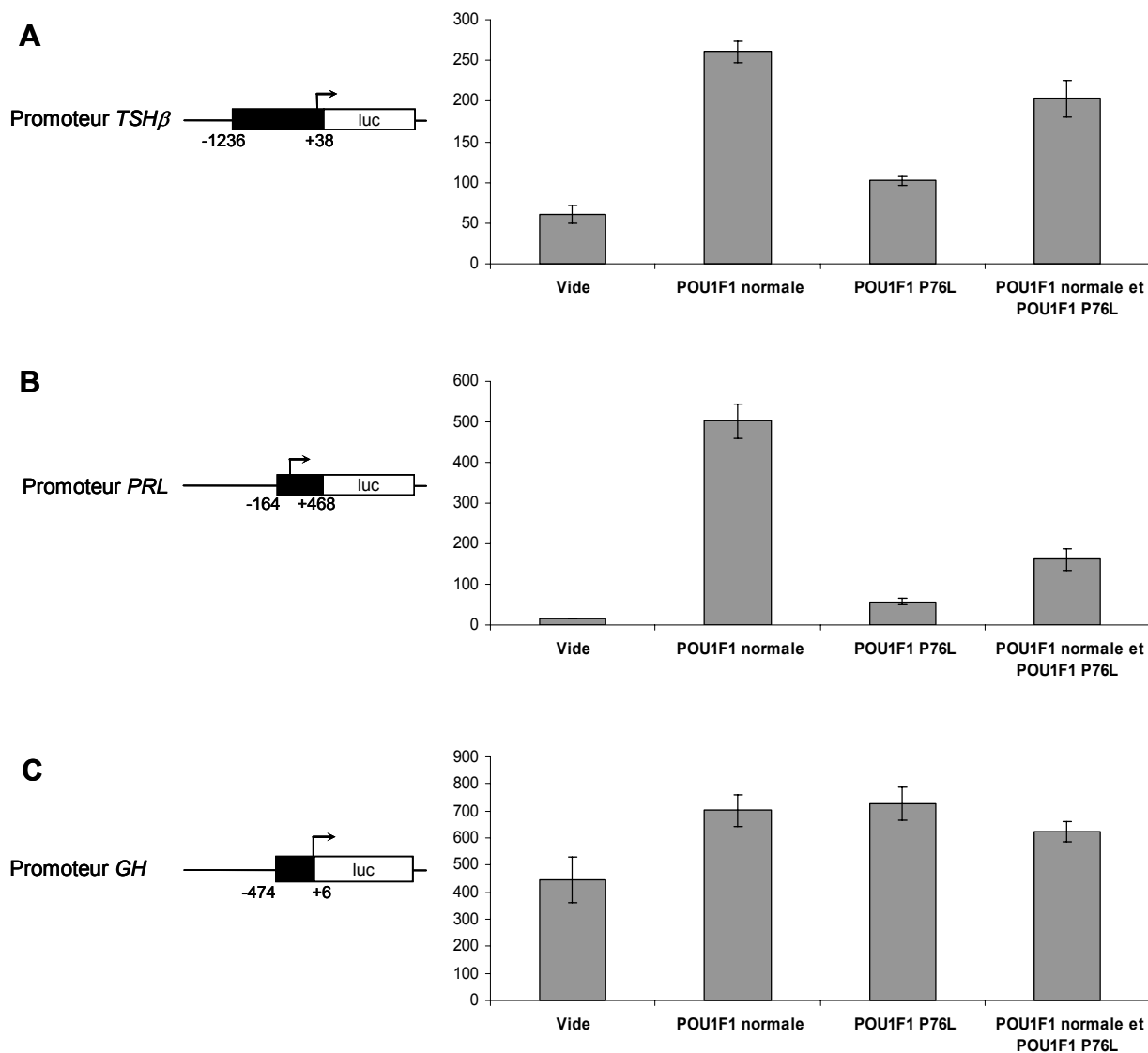


Figure 14 : Activation de la transcription par POU1F1 normale et P76L sur les promoteurs *TSHβ* (A), *PRL* (B) et *GH* (C) en cellules HEK293. Les cellules sont co-transfectées avec 100 ng de promoteur fusionné à un gène rapporteur (luciférase) et 50 ng de vecteur vide ou de POU1F1 normale, ou de POU1F1 P76L, ou d'un mélange POU1F1 normale et P76L. Une expérience représentative (réalisée en triplicate) est représentée ici.

La co-transfection des ADNc codant pour POU1F1 normale et POU1F1 P76L avec les promoteurs des gènes *GH*, *PRL* et *TSH β* fusionnés à un gène rapporteur (la luciférase) dans deux lignées cellulaires différentes (HEK293, lignée embryonnaire humaine de rein et GHFT1, lignée pituitaire murine) a été réalisée. En cellules HEK293, ces expériences montrent une diminution de l'activation au niveau des promoteurs *PRL* et *TSH β* (**Figure 14A et B**) et une activation du promoteur *GH* similaire (**Figure 14C**). Les essais luciférase en cellules GHFT1 nous apportent les mêmes résultats. Le phénotype des patients n'a donc pas pu être reproduit *in vitro* puisque les résultats sont à l'opposé de ceux attendus (diminution de l'activation de *GH* sans modification de l'activation de la *PRL* et *TSH β*).

D'autre part, des expériences de retard sur gel ont été réalisées aux Etats-Unis par l'équipe collaboratrice de Nancy Cooke et Stephen Liebhaber, et ont montré que la liaison de POU1F1 sur ses sites au niveau du promoteur *GH* et du LCR n'était pas altérée par la présence de la mutation (**Figure 15**), en accord avec sa localisation en dehors de l'homéodomaine.

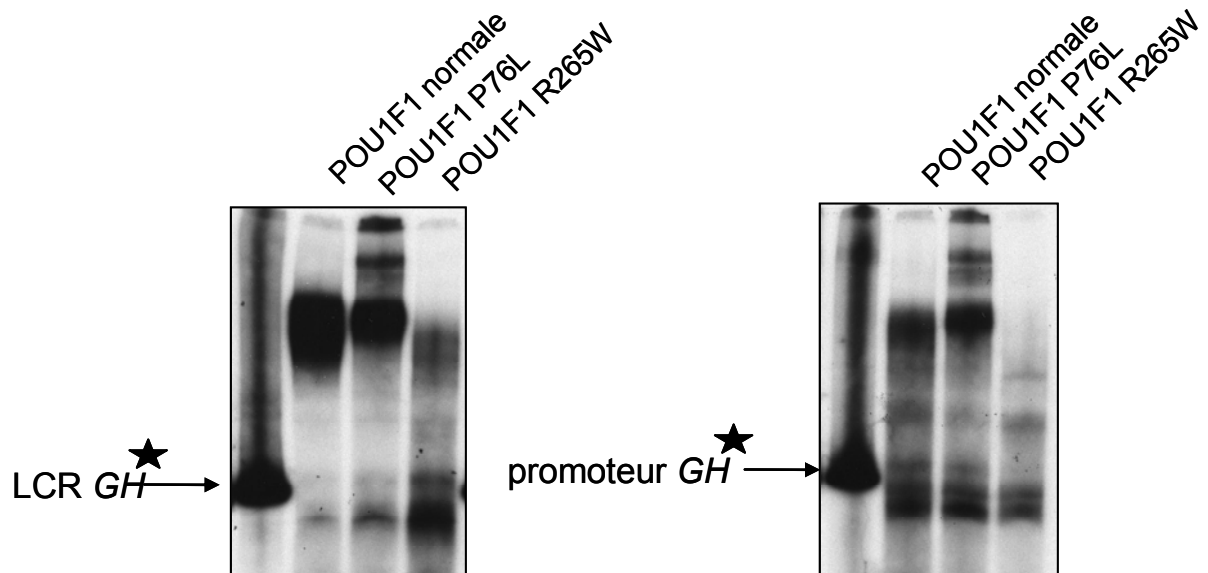


Figure 15 : La mutation POU1F1 P76L n'affecte pas la liaison à l'ADN au niveau du LCR *GH* ni au niveau du promoteur *GH*. Les protéines POU1F1 normale, P76L et R265W (protéine mutée au niveau de l'homéodomaine) étiquetée 6xHis sont purifiées sur une colonne de Nickel puis mises en contact avec leurs cibles ADN (LCR *GH* ou promoteur *GH*). L'interaction ADN-protéine en présence de la mutation POU1F1 P76L n'est pas affectée alors qu'elle est perdue en présence de la mutation R265W.

OBJECTIFS

Ce travail comporte deux objectifs principaux :

1. la recherche d'anomalies génétiques responsables de déficit en hormones pituitaires dans deux gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'hypophyse ;
2. la recherche de partenaires de POU1F1 au locus *GH*.

Les résultats obtenus par l'équipe du laboratoire [Amselem et al., 1989; Pantel et al., 2006; Netchine et al., 2000a; Machinis et al., 2001], incitent à poursuivre l'approche « gènes candidats » à partir des données des différents modèles animaux (modèles murins nains spontanés ou issus d'inactivation génétique) en analysant des gènes potentiellement importants dans les phénotypes non encore expliqués chez l'homme. De plus, la disponibilité des ADN constituant notre banque de prélèvements permet de réaliser ce type d'étude sur une cohorte importante de patients. La recherche de mutations est réalisée par séquençage des régions codantes et des séquences introniques flanquantes des gènes d'intérêt. Les gènes *SIX6* et *LHX2* ont été étudiés au cours de ce travail.

Lors d'une recherche de mutation de *LHX3* dans un but de diagnostic, deux nouvelles mutations ont été identifiées chez un patient issu d'une union non consanguine. Les effets fonctionnels de ces mutations ont été testés.

Le phénotype des patients IGHD, chez qui la mutation POU1F1 p.Pro76Leu a été identifiée, pourrait être expliqué par une anomalie de recrutement des partenaires de POU1F1 au niveau du LCR et/ou au niveau du promoteur *GH* puisque seule la lignée somatotrope est touchée. Nous avons choisi d'utiliser cette mutation comme un « outil » moléculaire permettant d'identifier les partenaires de POU1F1 au niveau du gène *GH* humain. En collaboration avec Tahar Bouceba de la plateforme « Interactions moléculaires en temps réel » de l'IFR83 (Equipe de Christophe Piesse, Campus Jussieu, Paris), nous avons choisi d'utiliser une approche basée sur la résonance plasmonique de surface (BIAcore). Cette approche permet dans un premier temps d'identifier l'impact de cette mutation sur son interaction avec ses séquences cibles ainsi que de déterminer les constantes cinétiques.

Dans un second temps, l'utilisation du BIAcore couplée à la spectrométrie de masse (en collaboration avec Gérard Bolbach de la plateforme « Spectrométrie de masse et protéomique » de l'IFR83) permettra d'identifier d'une part les partenaires

de la protéine POU1F1 normale au niveau du LCR et du promoteur *GH*, et d'autre part la différence de recrutement en présence de la mutation p.Pro76Leu.

Une étude de cristallographie du TAD a également été débutée en collaboration avec Emmanuelle Schmitt et Yves Méchulam du laboratoire BIOC de l'Ecole Polytechnique (Massy Palaiseau). Cette étude permettrait dans un premier temps de connaître la structure tridimensionnelle de ce domaine mais également de mettre en évidence les effets de cette mutation qui altère la régulation de l'expression du gène codant pour l'hormone de croissance.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Analyse génétique

L'ADN génomique est extrait à partir du sang des patients en utilisant les techniques standard d'extraction en suivant le protocole du fournisseur (FlexiGen DNA Kit, Qiagen). Au cours de ce travail, différents gènes ont été amplifiés.

1.1 *SIX6*

Patients

74 patients indépendants présentant un déficit en hormone hypophysaire (IGHD (n = 27), ou CPHD (n = 34), ou un déficit non défini (n = 13)) associé à des anomalies dans la morphologie de l'antéhypophyse ou de la post-hypophyse ou des anomalies oculaires ont été inclus dans cette étude. Tous les patients ont fourni un consentement écrit pour réaliser ces études génétiques.

Analyse moléculaire

La partie codante des deux exons du gène *SIX6* ont été amplifiée par PCR grâce à deux couples d'oligonucléotides déterminés à partir de la séquence génomique de *SIX6* (**Tableau 6A**) permettant d'obtenir deux amplicons de 1068 pb (exon 1) et de 579 pb (exon 2 partiel).

Après amplification, un aliquot de la réaction de PCR est migré sur gel d'agarose puis les fragments d'ADN sont purifiés par utilisation de l'enzyme Exo-SAP-IT (GE Healthcare). Les brins sens et anti-sens de chaque amplicon sont séquencés en utilisant le kit de séquençage Big Dye (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) avec les oligonucléotides décrits dans le **Tableau 6B**. Les réactions de séquence sont déposées sur le séquenceur 3730XL (Applied Biosystems) et analysées avec le logiciel SeqScape v2.6 (Applied Biosystems). Les variations de séquences sont numérotées avec l'adénine du codon d'initiation ATG comme étant le premier nucléotide (NC_000014.7).

A

Exon	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide anti-sens	Taille de l'amplicon
1	SIX6-Ex1F : ATAGTCCTGGCGTGCTGATT	SIX6 -Ex1R : CATAACGCAGGGCTCTTAAC	1068 pb
2	SIX6-Ex2F : CTTAACTGCTGGGGTCTTCG	SIX6 -Ex2R : TTCCGAAGGAGACTTTGCAG	579 pb

B

Exon	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide anti-sens
1	SIX6-Ex1-seqF1 : AGCTTTGATTGGCAGAGCCA	SIX6-Ex1-seqR1 : ACTCCTGCTGAATTGGAGTC
1	SIX6-Ex1-seqF2 : ACCACAAGTTCACCAGGGAG	SIX6-Ex1-seqR2 : TAGTGTGCTTCAAGCCACAG
2	SIX6-Ex2-seqF : TCTTCGGAAGAACCTCTAGC	SIX6-Ex2-seqR : GGATTTGCAGGTCTCTCATC

Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification génomique et le séquençage des deux exons de *SIX6*. La taille des amplicons et les séquences oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification (A) et pour le séquençage (B) sont indiquées.

1.2. *LHX2*

Les ADN de 76 patients présentant un déficit pituitaire, une post-hypophyse ectopique ou non visible associé à un défaut oculaire ont été analysés. Les cinq exons de ce gène sont amplifiés selon le protocole décrit dans la partie Résultats.

1.3 *POU1F1* et LCR *GH*

Patients

300 ADN de patients indépendants présentant un IGHD ont été analysés pour une recherche de variations au niveau du LCR *GH*. Une recherche de variation de séquence du TAD de *POU1F1* (exons 1, 2 et 3) a également été réalisée pour 250 ADN de ces 300 patients. Les ADN de patients testés avaient préalablement été analysés pour d'autres gènes impliqués dans les IGHD non syndromique (*GH*, *GHRHR*, *GHSR*).

Tous les patients ont fourni un consentement écrit pour réaliser ces études génétiques.

Analyse moléculaire

Les trois premiers exons du gène *POU1F1*, codant pour le TAD sont amplifiés par PCR grâce à trois couples d'oligonucléotides déterminés à partir de la séquence génomique de *POU1F1* (**Tableau 7A**) permettant d'obtenir trois amplicons de 389 pb, 359 pb et 466 pb respectivement.

Les amplicons sont purifiés comme décrit précédemment. La réaction de séquençage est réalisée avec les oligonucléotides portant une extrémité universelle : ces oligonucléotides comportent entre 37 et 44 bases, ils sont constitués d'une portion, en 5', identique au laboratoire pour toutes les amorces (différente entre l'oligonucléotide sens et l'oligonucléotide anti-sens, voir légende **Tableau 7**) et une portion spécifique du gène amplifié (**Tableau 7A**). Les produits de PCR générés sont séquencés avec les oligonucléotides sens et anti-sens uniques au laboratoire. Les variations de séquences sont numérotées avec l'adénine du codon d'initiation ATG comme étant le premier nucléotide (NT_022459).

De la même manière, la séquence d'ADN génomique correspondant au LCR *GH* est amplifiée permettant d'obtenir un fragment de 432 pb (de -15216 à -14784 pb par rapport au site d'initiation de la transcription) comportant les trois sites de fixation de POU1F1. Ces fragments sont ensuite séquencés avec les oligonucléotides présentés dans le **tableau 7B**.

A.

Exon	Oligonucléotides sens	Oligonucléotides anti-sens	Taille de l'amplicon
1	POU1F1_1S : CCCTCCTGGTGCCTCAGAGC	POU1F1_1AS : TGGAGGGGTAAAATGAAAGATGCAA	389
2	POU1F1_2S2 : CGTCAGAGAACTTACCCAAAATG	POU1F1_2AS : TGTCACACTCTGATCACAATTCTT	359
3	POU1F1_3S : GGCTAAGTCAGGCAAAACCCTTTC	POU1F1_3AS :TGTTTTTGGAGGATTTCCATAACGAC	466

B.

Oligonucléotide sens	Oligonucléotide anti-sens	Taille de l'amplicon
PromGH1s : ACACACACACACACCCCCACA	PromGH2as : CTCTCAAGGGGTGCAGGCCAG	432

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification des trois premiers exons de *POU1F1* (A) et du LCR *GH* (B). A, Les amorces oligonucléotidiques sont précédées de queues universelles (ACCGTTAGTATGCGAGTT pour les oligonucléotides sens et TCGGATAGTCAGTCGTTT pour les oligonucléotides antisens). La taille des amplicons est également indiquée (en paire de base). B, La taille de l'amplicon est indiquée.

2. Recherche de partenaires de POU1F1

2.1 Synthèse des cibles ADN

Pour cette approche de résonance plasmonique de surface, il est nécessaire d'amplifier des fragments d'ADN qui seront immobilisés sur la puce. Deux séquences cibles différentes seront utilisées.

La première est constituée des 70 pb correspondant aux deux sites de fixation de la protéine POU1F1 au niveau du promoteur de *GH*. La cible d'ADN double brin est obtenue par une hybridation de deux oligonucléotides complémentaires de 70 pb dont l'un des deux est biotinylé en 5'. Huit microtubes contenant chacun $1/20^e$ d'oligonucléotides biotynilés à 1 μ M sont mis en présence de $1/2^e$ volume d'oligonucléotides non biotynilés à la même concentration (**Tableau 8**) et le volume est ajusté à 50 μ l par ajout de HBS-EP (tampon utilisé sur le BIAcore). Afin que tous les oligonucléotides biotynilés soient sous la forme d'ADN double brin, la quantité d'oligonucléotide non biotinylé est en excès de 10 fois [Majka et Speck, 2007]. Dans un thermocycleur, le tube contenant les deux oligonucléotides simple brin est chauffé à 95°C pendant 10 minutes puis la température est diminuée très progressivement à 25°C (avec une perte de 0,6°C par minute) afin de favoriser la formation de l'ADN double brin.

La seconde cible ADN est constituée des 212 pb contenant les trois sites A, B et C de fixation de POU1F1 au niveau du LCR *GH*. Cet ADN est obtenu par une amplification par PCR grâce à l'utilisation d'ADN génomique humain commercial (Roche) en présence des oligonucléotides spécifiques dont l'un est biotinylé en 5' et de la Taq polymérase Finnzyme (enzyme de haute fidélité). 5 μ l de chacun des oligonucléotides à 5 pmol/ μ l (oligonucléotide sens biotynilé et oligonucléotide anti-sens non biotynilé, **Tableau 8**) est mis en présence de la Taq polymérase (1 unité), de son tampon spécifique, de 5 μ l de dNTP à 2 mM et de 1 μ l d'ADN génomique (200 ng) et le volume est ajusté à 50 μ l par tube avec de l'eau. Après une étape de dénaturation, 35 cycles d'amplification (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 50°C, 30 secondes à 72°C) sont nécessaires à l'obtention des fragments d'ADN. Ces amplicons sont ensuite purifiés selon le protocole du Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) puis concentrés par évaporation jusqu'à l'obtention

d'une concentration de 1 μ M. La séquence nucléotidique est vérifiée par séquençage avant utilisation sur le BIAcore 3000.

	Promoteur <i>GH</i>	LCR
Oligonucléotide sens	5'-GGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAAAGCCCGTC AGTGGCCCCATGCATAAATGTACACAGAAACAGGT-3'	5'-GCTCAGGAAGAGTATTTTCCT-3'
Oligonucléotide anti-sens	5'-ACCTGTTTCTGTGTACATTTATGCATGGGGCCACT GACGGGCTTGTGCTAATGGATAATTTAGAAGCTCC-3'	5'-TTTCCAGATGTTCCAAATGA-3'

Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour l'hybridation du promoteur *GH* et l'amplification par PCR du LCR. Les oligonucléotides sens sont biotynilés en 5'.

A

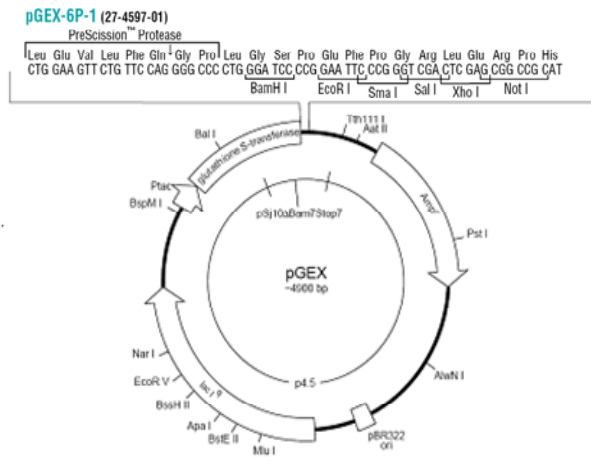
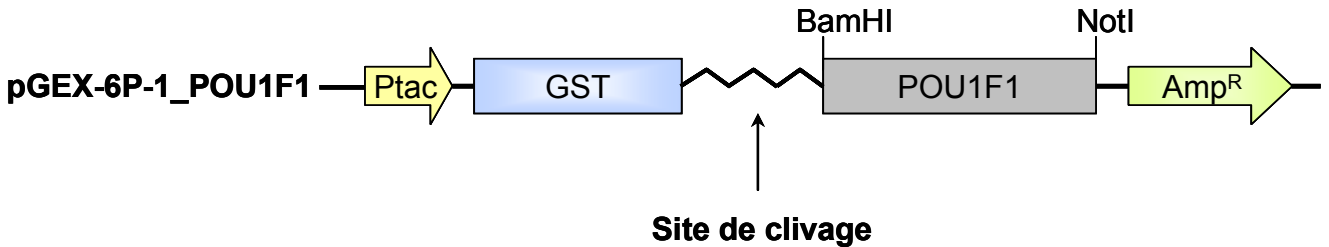
**B**

Figure 16 : Vecteur pGEX-6P-1 et clonage de *POU1F1*. A, Carte du vecteur pGEX-6P-1, l'ADNc inséré est sous le contrôle du promoteur *tac* (Ptac) et le vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline. La localisation de la GST ainsi que le site de clonage sont indiqués. B, Représentation schématique du plasmide pGEX-POU1F1. Le site de clivage de la PreScission Protease ainsi que les sites utilisés pour l'insertion de l'ADNc sont indiqués.

2.2 Protéines recombinantes

Le système utilisant la Glutathion S-transférase (GST) permet l'expression et la purification de protéines recombinantes produites dans *Escherichia coli* (*E. coli*). Ce système est basé sur l'expression inductible de gènes fusionnés à la GST, permettant la production d'une protéine de fusion contenant la GST en N-terminal et la protéine d'intérêt en C-terminal. Ces protéines recombinantes ont été obtenues en insérant l'ADNc de *POU1F1* dans le site de clonage multiple du vecteur pGEX-6P-1 (GE Healthcare) (**Figure 16A**). L'expression de ce vecteur est placée sous le contrôle du promoteur *tac*, inductible par l'isopropyl β -D thiogalactoside (IPTG). Le vecteur pGEX-6P-1 contient également le gène *lacI^q* qui permet l'expression d'une protéine se liant à la région de l'opérateur du promoteur *tac*, réprimant ainsi l'expression de la protéine de fusion en l'absence de l'IPTG. Ce système permet de contrôler l'expression des protéines d'intérêt.

Les protéines de fusion peuvent alors être purifiées à partir de lysats bactériens par chromatographie d'affinité utilisant du glutathion immobilisé sur des billes de sépharose. En effet, la GST a une très forte affinité avec son substrat le glutathion, ce qui va permettre la capture des protéines de fusion sur les billes, les protéines contaminantes seront éliminées lors des étapes de lavage.

Le vecteur pGEX-6P-1 présente également un site de reconnaissance à l'enzyme PreScission Protease qui permet le clivage de la GST et l'obtention de la protéine purifiée sans son étiquette GST (**Figure 16B**).

2.3 Construction des plasmides – Mutagénèse dirigée

L'ADNc de *POU1F1* a été amplifié par PCR à partir d'une construction p.Tracer *POU1F1*-wt [Tenenbaum-Rakover et al., 2011] à l'aide d'un couple d'oligonucléotides spécifiques (**Tableau 9**). En absence de sites de restriction compatibles pour l'insertion de l'ADNc de *POU1F1* dans notre vecteur d'intérêt, les amorces utilisées ont été conçues afin d'introduire les sites de restriction BamHI en 5' et NotI en 3' (**Figure 16B**).

Après digestion par les enzymes BamHI et NotI du fragment *POU1F1* amplifié et du vecteur pGEX-6P-1, une étape de ligation de l'ADN d'intérêt dans le vecteur est réalisée selon le protocole du fabricant (Promega®). Les extrémités libres du vecteur digéré sont déphosphatées par incubation dans le tampon SAP de la phosphatase du kit Phosphatase Alkaline Shrimp (Roche®) pendant 15 minutes à 37°C puis 1/20^e du volume final de phosphatase est ajouté et réincubé 15 minutes à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée par incubation de 10 minutes à 65°C. Le vecteur ainsi préparé est incubé avec l'insert digéré en présence de T4 DNA ligase (Promega®) pendant 16 heures à 16°C. La ligation est réalisée dans des petits volumes (10 µl) afin de faciliter le rapprochement des extrémités cohésives de l'insert et du vecteur et de favoriser ainsi l'action de l'enzyme. La quantité d'insert est en excès par rapport au vecteur (ratio 1:4) dans le but d'augmenter les probabilités d'insertion dans le vecteur.

L'insertion du fragment d'ADNc de *POU1F1* dans les sites BamHI/NotI du vecteur pGEX-6P-1 permet d'être en phase avec la séquence codant pour la glutathione S-transférase présente en 5' dans le vecteur.

Dans un premier temps, le vecteur pGEX-6P-1_*POU1F1*-normale a été transformé dans une souche bactérienne *E. coli* Top-10 chimiocompétente (Invitrogen®) dans les conditions standards. Les bactéries transformées ont ensuite été cultivées dans une boîte d'agarose contenant l'antibiotique de sélection, l'ampicilline, et mises en culture à 37°C, toute la nuit. Plusieurs clones obtenus sont multipliés dans deux millilitres de LB-ampicilline. Après 16 heures de culture sous agitation et à 37°C, les cultures bactériennes contenant les plasmides amplifiés sont récupérées et purifiées à l'aide du kit NucleoBond® (Macherey-Nagel) selon les indications du fabricant. Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 3000g puis

remises en suspension dans 300 µl de tampon S1. Les bactéries sont ensuite lysées dans 300 µl de tampon S2 puis la réaction est stoppée par l'ajout de 300 µl de tampon de neutralisation S3. Le mélange de bactéries lysées et des différents tampons du kit est ensuite centrifugé 15 minutes, à 14000g. L'ADN plasmidique est ensuite précipité grâce à l'ajout d'isopropanol et lavé avec de l'éthanol à 70%. Puis, les culots d'ADN sont séchés et repris dans de l'eau. Parmi les clones de bactéries ayant intégré un plasmide, il est nécessaire de sélectionner ceux qui ont intégré le plasmide muni de l'insert. La nature de chacun des ADN plasmidiques obtenus est vérifiée par séquençage. Le clone qui présente une séquence sans mutation est utilisé par la suite.

Dans un second temps, une réaction de mutagenèse est réalisée sur le plasmide pGEX-6P-1_POU1F1-normale avec des oligonucléotides (**Tableau 9**) permettant l'obtention des plasmides pGEX-6P-1_POU1F1-P76L (p.Pro76Leu), pGEX-6P-1_POU1F1-T75N (p.Thr75Asn) et pGEX-6P-1_POU1F1-R265W (p.Arg265Trp) en suivant les indications du fabricant (Quick Change® Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Le plasmide pGEX-6P-1_POU1F1-R265W permet d'obtenir une protéine mutée dans l'homéodomaine connue pour sa perte d'interaction avec l'ADN et sera utilisé par la suite comme contrôle négatif lors de l'étude d'interaction ADN-protéine. De la même manière que précédemment, les ADN plasmidiques codant pour les protéines recombinantes mutantes sont amplifiés puis vérifiés par séquençage.

Nom	Séquence oligonucléotidique
POU1F1-5' BamHI	5'-CTCGGATCCGGAATGAGTTGC-3'
POU1F1-3' NotI	5'-GAGGCGGCCGCATCTTATCTG-3'
POU1F1-R265W-sens	5'-GTTTTGCAACTGGAGGCAGAG-3'
POU1F1-R265W-antisens	5'-CTCTGCCTCCAGTTGCAAAAC-3'
POU1F1-P76L-sens	5'-AGTTTAACCCTTTGTCTTTAT-3'
POU1F1-P76L-antisens	5'-ATAAAGACAAAGGGTTAAACT-3'
POU1F1-T75N-sens	5'-TAGTTTAACCATTTGTCTTTA-3'
POU1F1-T75N-antisens	5'-TAAAGACAAATGGTTAAACTA-3'

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés pour l'obtention des plasmides pGEX-6P-1_POU1F1-normale, P76L, T75N et R265W.

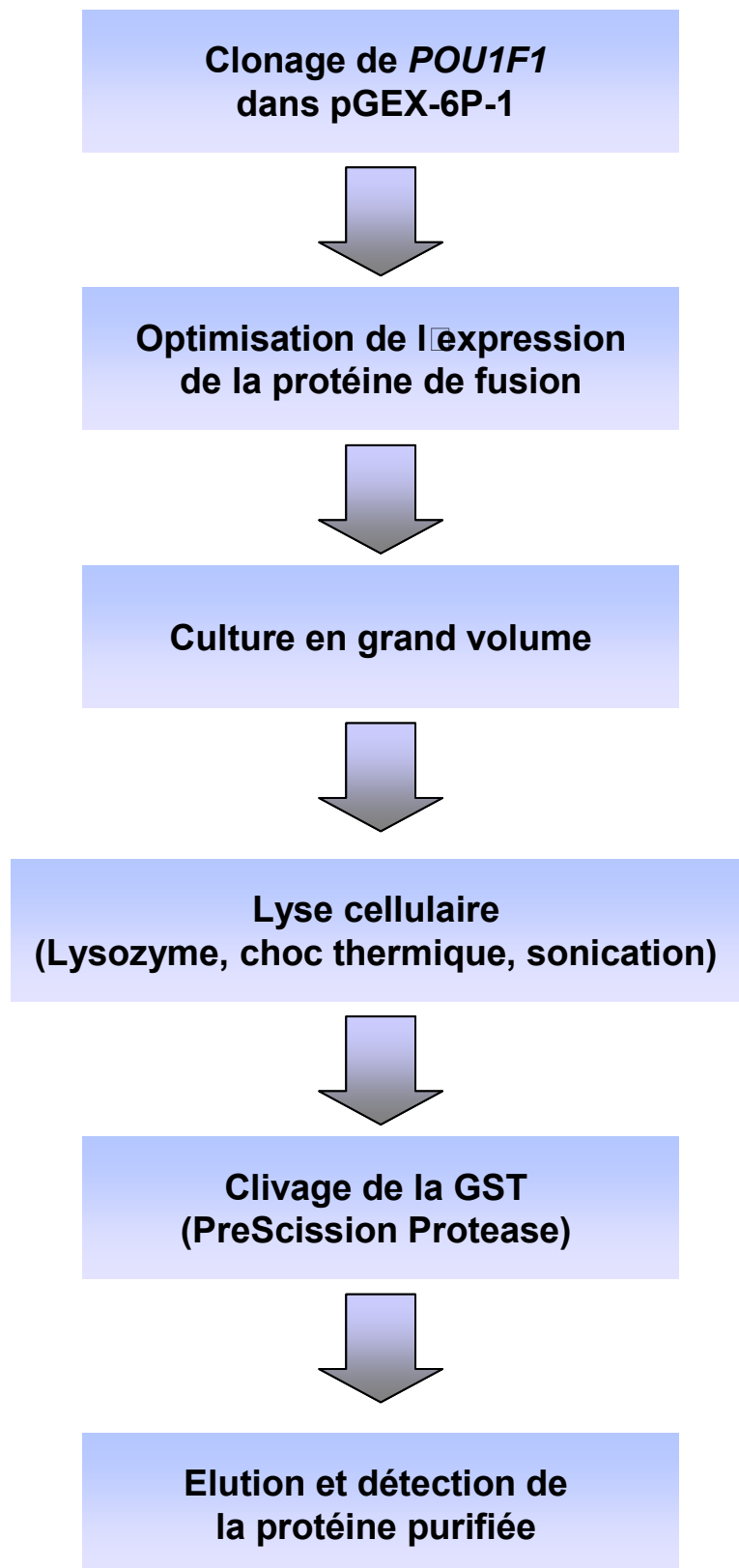


Figure 17 : Représentation des différentes étapes du protocole de production et de purification de protéines POU1F1 recombinantes.

2.4 Production de la protéine recombinante

Afin de produire les protéines recombinantes, la souche bactérienne *E. coli* BL21 DE3 Star (Invitrogen) spécialement adaptée est utilisée. Les bactéries BL21 DE3 Star sont transformées avec les plasmides pGEX-6P-1_POU1F1-normale, pGEX-6P-1_POU1F1-P76L, pGEX-6P-1_POU1F1-T75N et pGEX-6P-1_POU1F1-R265W.

Des essais d'expression à petite échelle sont menés sur quelques dizaines de clones. Pour cela, les colonies choisies au hasard sont mises en culture dans 200 µl de LB-ampicilline, à 37°C, sous agitation, toute la nuit. Le lendemain, 1,8 ml de LB sont ajoutés puis ré-incubés permettant aux bactéries de se multiplier à nouveau. Après une heure, la culture de 2 ml est divisée en deux : 1 ml permet d'avoir un contrôle négatif d'expression de la protéine recombinante et 1 ml est induit avec 0,5 mM d'IPTG. Après 3 heures d'induction, les cultures sont centrifugées 15 minutes, 3000g, à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont repris dans 150 µl de tampon ESB (125 mM Tris HCl pH6.8, 5% SDS, 4% sucrose, 700 mM 2-mercaptoethanol, bleu de bromophénol). Un aliquot de 15 µl de chaque culture testée est ensuite migré sur gel de polyacrylamide (voir Electrophorèse).

Cette étape est importante pour la sélection du clone ayant une expression optimale de la protéine afin de réaliser la production et la purification à grande échelle dans les meilleures conditions (**Figure 17**).

Pour la production de protéines recombinantes à grande échelle (1 litre final), une pré-culture de 100 ml est réalisée. Le lendemain, 900 ml sont ajoutés à la pré-culture et la densité optique (DO) des bactéries est vérifiée régulièrement. Lorsque la DO de la culture pGEX-6P-1_POU1F1-normale est comprise entre 0,1 et 0,2, 0,5 mM d'IPTG sont ajoutés et la culture est incubée 3 heures à 37°C, sous agitation. La culture est ensuite transférée en tubes de 50 ml puis centrifugée 20 minutes à 3000g, à température ambiante afin de récupérer les culots bactériens contenant la protéine recombinante (Etape 1, **Figure 18**).

Les conditions optimales de culture pour les mutants pGEX-6P-1_POU1F1-P76L, pGEX-6P-1_POU1F1-T75N et pGEX-6P-1_POU1F1-R265W diffèrent de celle de la protéine POU1F1-normale et seront détaillées dans la partie Résultats.

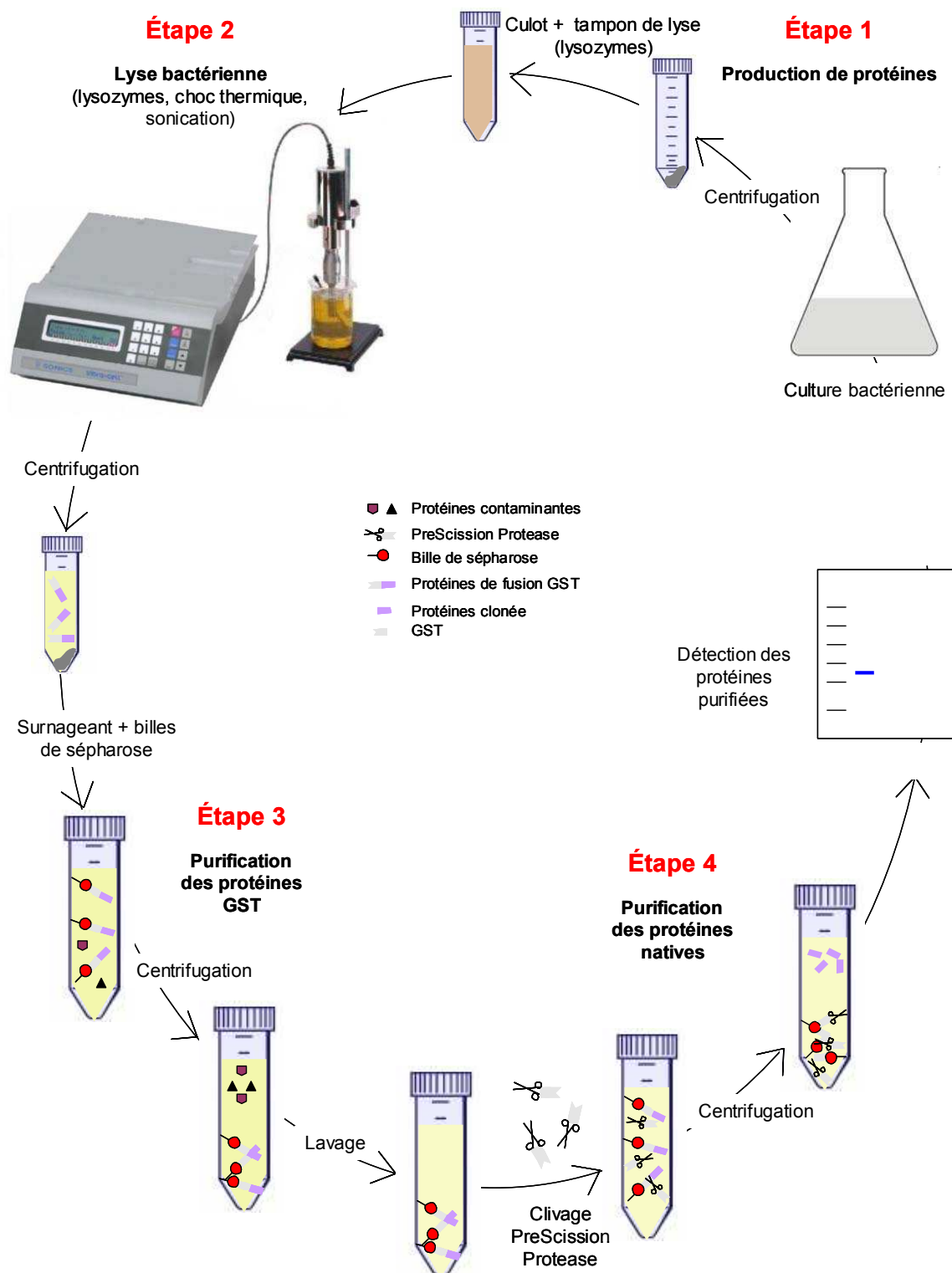


Figure 18 : Représentation schématique de la production et de la purification des protéines recombinantes. Etape 1, Les bactéries sont induites avec de l'IPTG. Etape 2, Les bactéries sont ensuite lysées puis centrifugées. Etape 3, Des billes de sépharose sont ajoutées au surnageant bactérien. Etape 4, La PreScission Protease permet le clivage de la GST. Les protéines purifiées sont détectées sur gel d'acrylamide (révélation).

2.5 Purification des protéines recombinantes

Les conditions de purification restent les mêmes quelle que soit la protéine recombinante à préparer.

Les cellules bactériennes sont lysées en trois étapes. Les culots sont d'abord repris avec 200 ml d'un tampon de lyse constitué de PBS 1X, 375 mM NaCl, 2 mM β -Mercapto-éthanol, 1 % Triton-X100, 10 % glycérol et 1 mg/ml de lysozyme et incubés pendant 30 minutes dans la glace. Puis trois cycles de congélation/décongélation sont réalisés (Bain d'azote liquide puis bain-marie à 37°C). Les cellules subissent ensuite des cycles de sonication : une sonde de 6 mm (Sonde W72437, Fisher BioBlock Scientifics) est plongée dans le surnageant conservé dans la glace. Dix cycles de sonication (30 secondes d'ultrason et 30 secondes d'arrêt) sont réalisés à une puissance de 60% des capacités de l'appareil (VibraCell 75185, Fisher BioBlock Scientifics) (Etape 2, **Figure 18**).

Les tubes sont ensuite centrifugés à 22000g, à 4°C pendant 20 minutes permettant ainsi de culotter la fraction insoluble et de séparer le surnageant contenant les protéines solubles dont les protéines recombinantes d'intérêt. Le surnageant est ensuite incubé en présence de billes de sépharose (Gluthatione-Agarose, Sigma) sur lesquelles est fixé le glutathion (40 ml de billes en suspension), pendant 30 minutes à température ambiante et sur une roue permettant une agitation homogène constante (Etape 3, **Figure 18**). Les billes sont ensuite centrifugées 15 minutes, 500g, à 4°C puis lavées 4 fois avec du PBS1X. Un dernier lavage dans un tampon de clivage est réalisé (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Les billes sur lesquelles sont fixées les protéines recombinantes étiquetées avec la GST sont ensuite incubées avec 40 ml d'une solution de PreScission Protease (GE HealthCare) (600 μ l de PreScission Protease (1 U/ μ l) + 39,4 ml de tampon de clivage) pendant 4 heures, à 4°C, sur roue. L'enzyme clive l'étiquette GST et libère ainsi la protéine recombinante (Etape 4, **Figure 18**). Les billes sont ensuite centrifugées 15 minutes, 500g, à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est conservé à 4°C. Un second lavage des billes est réalisé en présence d'un tampon de clivage plus concentré en sel (1 M NaCl) afin d'optimiser la récupération des protéines.

Pour contrôler la qualité de la purification et la quantité de protéines purifiées, une électrophorèse est réalisée ultérieurement avec différents aliquots prélevés au fur et à mesure du protocole.

2.6 Concentration des protéines et dialyse

Les 40 ml de protéines purifiées sont ensuite concentrés par utilisation de colonne Corning® Spin-X® UF 20 ml, 10000 MWCO suivant les recommandations du fabricant. Après avoir équilibré le filtre de la colonne avec le tampon de clivage, les protéines sont centrifugées dans la colonne à 4500g, 4°C jusqu'à obtention d'un volume de 2 à 5 ml.

Les protéines sont ensuite dialysées dans un volume de 200 ml de tampon HBS (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA) à 4°C, pendant une heure, puis le tampon est changé et la dialyse se poursuit durant une nuit.

2.7 Electrophorèse et western blot

Les aliquots prélevés au cours des étapes de purification sont incubés 5 minutes à 95°C dans un tampon de migration de protéine 1X (62,5 mM Tris HCl pH6.8, 3% SDS, 10% glycérol, bleu de bromophénol) puis migrés sur gel d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide 37,5/1 ; gel de concentration à 12% : 125 mM Tris, pH 6.8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,1%TEMED ; gel de séparation à 4,5% : 390 mM Tris, pH 6.8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,1%TEMED). La migration s'effectue dans un tampon TGS (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 0,1 % SDS ; Biorad) pendant 1h30 à 150 V.

Après la migration, le gel peut être coloré au bleu de coomassie ou être transféré sur une membrane PVDF (Invitrogen). Le transfert du gel sur membrane PVDF s'effectue dans un tampon TG (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine ; Biorad + 20% méthanol). Après le transfert, la membrane est incubée toute la nuit dans une solution de PBS 1X/Tween 20/Lait 5% afin de limiter les interactions non spécifiques de l'anticorps sur la membrane. L'anticorps polyclonal primaire anti-POU1F1 humain produit chez la chèvre (N-20, sc-16288, Santa Cruz) est dilué au 1/500^e dans la

solution de lait 5% et est incubé pendant une heure à température ambiante sous agitation. Trois lavages successifs au PBS 1X sont effectués puis la membrane est mise en contact avec l'anticorps secondaire anti-chèvre HRP produit chez le singe (dilution au 1/2000^e) pendant une heure, sous agitation et à température ambiante. Les protéines fixées sur la membrane sont ensuite révélées par chimioluminescence avec le kit SuperSignal West Dura (Pierce).

2.8 Préparation des extraits nucléaires

Actuellement, il n'existe pas de lignée pituitaire humaine. Différentes lignées cellulaires pituitaires murines (Pit1/0, Pit Triple, Pit/Prl [Sizova et al., 2010], et GHFT1) ou de lignées humaines non pituitaires (N-TERA, MCF7) connues pour exprimer POU1F1 sont utilisées pour cette étude de recherche de partenaires.

Ces différentes lignées sont toutes cultivées dans du milieu de culture DMEM (Invitrogen) enrichi avec 10 % de sérum de veau fœtal et en présence de pénicilline et streptomycine (milieu complet), dans une atmosphère à 37°C, 5% CO₂.

Les cellules sont lavées au PBS 1X, décollées avec de la trypsine 0,8X puis l'action de la trypsine est inhibée par ajout de DMEM complet. Les cellules sont ensuite centrifugées 10 minutes à 1200g puis lavées au PBS 1X. Pour une flasque de 75 cm² à confluence, le culot de cellules est repris avec 400 µl de tampon A (10 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) et incubé 15 minutes dans la glace. Puis, 15 µl de tampon B (NP40 à 10%) sont ajoutés et centrifugés 30 secondes à 12000g. Le culot est repris avec 40 µl de tampon C (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM PMSF), incubé dans la glace pendant 15 minutes puis centrifugé 5 minutes à 12000g. Le surnageant contient les protéines nucléaires qui seront utilisées dans l'approche de couplage BIAcore avec la spectrométrie de masse.

2.9 BIAcore

Les analyses de résonance plasmonique de surface ont été réalisées sur l'appareil BIAcore 3000 (GE HealthCare) appartenant à l'Institut de Biologie

Intégrative (IFR83, Campus de Jussieu, Paris). Les expériences sont effectuées en collaboration avec l'équipe « Interactions biomoléculaires en temps réel » (IFR83).

Après trois préconditionnements de la puce avec une solution 1 M NaCl, 50 mM NaOH à un flux de $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ de tampon HSP-Ep (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% (v/v) P20), les séquences cibles ADN sont fixées de manière covalente sur la puce SA (SA sensor Chip, GE HealthCare). 75 μL d'ADN à 500 nM sont injectés sur la puce (693 ng du promoteur *GH* ou 2100 ng du LCR ou 1395 ng du mélange promoteur *GH* et LCR). Les résultats en unité de résonance (RU) indiquent que 1,1 ng d'ADN du promoteur GH, 3,3 ng de LCR et 2,9 ng du mélange des deux cibles ADN ont été fixés sur la puce.

Les études d'interaction ADN-protéines sont réalisées en présence de 25 μL de protéines POU1F1-normale, P76L ou T75N à 50 nM et sont injectées sur la puce pendant 5 minutes dans le tampon HBS-EP enrichi avec 1 mM MgCl_2 afin de favoriser les interactions. Les cinétiques ont été réalisées avec des concentrations de protéines purifiées comprises entre 0 et 100 nM. Entre deux expériences, la puce est régénérée par l'application d'une solution de SDS 0,1% ($15 \mu\text{L}$ à $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$), afin de décrocher les protéines. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel BIAeval.

L'étude de recherche de partenaires de POU1F1 au niveau du locus *GH* a été réalisée avec POU1F1-normale (200 nM) préalablement incubée avec 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de protéines provenant d'extraits nucléaires. Ces protéines sont injectées dans un tampon HBS-N (HEPES 10 mM, 150 mM NaCl, 3mM EDTA) enrichi avec 1mM MgCl_2 et 0,001% AALS (*Anionic Acid Labile Surfactant*, ALS-110, ProteaBio Europe). Le SDS n'étant pas compatible avec l'utilisation de la spectrométrie de masse, le tampon d'élution et de récupération utilisé est de l'AALS à 0,1%. La programmation de l'expérience est permise grâce à l'utilisation du logiciel Wizard Analyte Recovery (BIAcore 3000 software, GE HealthCare).

2.10 Spectrométrie de masse

L'AALS contenu dans la fraction éluée (10 μL) est digéré par un volume de NH_4HCO_3 50 mM et 1 μL de TFA 20 % (acide trifluoroacétique, 1 % final) pendant 20 minutes à température ambiante. L'éluat est ensuite préparé à la digestion trypsique

par ajout de 8 µl de NH_4HCO_3 50 mM pH 8.0 (Bicarbonate d'ammonium, 20 mM final) et de 2 µl de DTT 45 mM (3 mM final) puis incubé 15 minutes à 50°C. La réduction alcaline est réalisée avec 2 µl d'iodoacétamide (IAA) à 100 mM (6 mM final) pendant 15 minutes, à température ambiante, dans le noir.

Ensuite, 20 ng de trypsine diluée à 20 ng/µl dans du NH_4HCO_3 50 mM sont ajoutés puis incubés une nuit à 37°C. L'échantillon digéré est mélangé à 10 µl d'acétonitrile puis filtré sur une colonne ZipTip C8 selon les recommandations du fabricant (Millipore). Les peptides sont élués avec une solution d'acétonitrile, TFA, et de matrice HCCA (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) à 5 mg/ml.

L'analyse peptidique est réalisée sur MALDI TOF-TOF (Applied Biosystem 4700 Proteomic Analyzer) et les données sont analysées grâce à la base de données Mascot.

3. Cristallographie

3.1 Clonage du TAD de POU1F1

Les ADNc codant pour les 128 ou les 110 premiers acides aminés de la protéine POU1F1 (POU1F1₁₋₁₂₈ et POU1F1₁₋₁₁₀ respectivement) ont été clonés dans le vecteur pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen) permettant un étiquetage 6xHis (six histidines consécutives) en C-terminal. L'expression de ce vecteur est placée sous le contrôle du promoteur T7. Ces plasmides sont insérés dans la souche de bactéries chimio-compétentes *E. coli* BL21-AI (Invitrogen) selon les conditions standards de transformation. Cette souche bactérienne contient une insertion chromosomique du gène codant pour la T7 RNA polymerase (T7 RNAP) dans le locus *araB*, plaçant ainsi la T7 RNAP sous le contrôle du promoteur *araB* qui est inductible à l'arabinose.

3.2 Expression du TAD de POU1F1

Des essais d'expression à petite échelle ont été réalisés sur quelques dizaines de clones de la manière décrite précédemment (voir paragraphe 2.4 Production de la protéine recombinante). L'induction bactérienne est réalisée avec 1 mM IPTG et 0,2% arabinose.

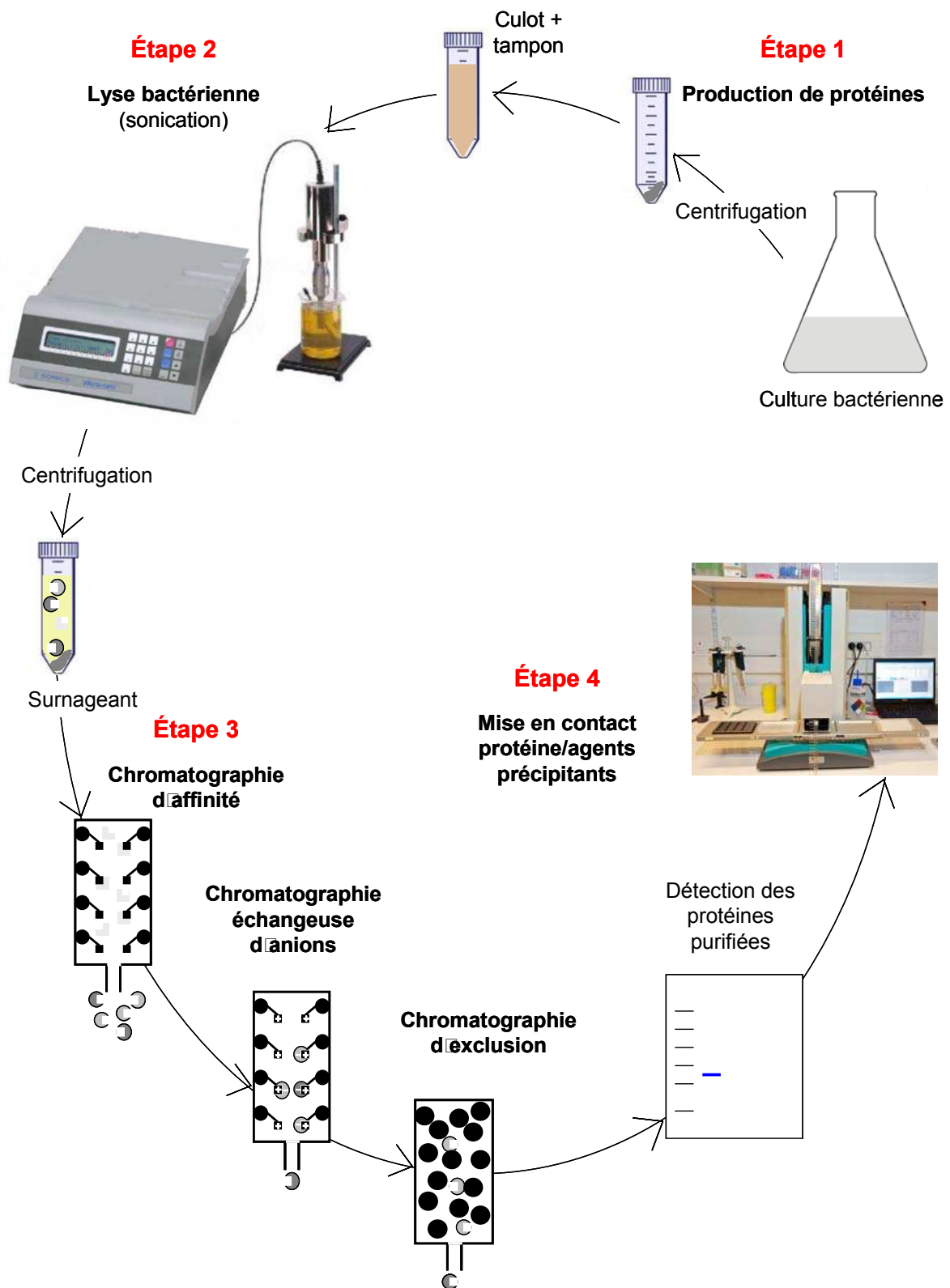


Figure 19 : Représentation schématique de la production et de la purification des peptides recombinants. Etape1, Les bactéries sont induites avec de l'IPTG et de l'arabinose. Etape 2, Les bactéries sont lysées par sonication puis centrifugées. Etape 3, Les protéines contenues dans le surnageant sont purifiées par chromatographie d'affinité, puis échangeuse d'anions et enfin d'exclusion. Etape 4, Après vérification de la pureté des échantillons, les protéines sont mises en contact avec les agents précipitants grâce à une méthode robotisée.

Pour la production de protéines recombinantes à grande échelle (1 litre final), une pré-culture de 100 ml est réalisée. Le lendemain, 900 ml de milieu sont ajoutés à la pré-culture et la densité optique (DO) des bactéries est vérifiée régulièrement. Lorsque la DO de la culture POU1F1₁₋₁₂₈ normale est à 0,4, 1 mM d'IPTG et 0,2% d'arabinose sont ajoutés et l'incubation dure 4 heures à 37°C, sous agitation. La culture est ensuite transférée en tubes de 50 ml puis centrifugée 20 minutes à 3000g, à température ambiante afin de récupérer les culots bactériens contenant la protéine recombinante (**Figure 19**, Etape 1).

Les conditions de cultures pour les mutants POU1F1₁₋₁₂₈ P76L et POU1F1₁₋₁₂₈ T75N diffèrent de celles de la protéine POU1F1₁₋₁₂₈ normale et sont détaillées dans le **tableau 10**. Les conditions de culture des formes plus courtes (POU1F1₁₋₁₁₀) sont identiques à celles des protéines POU1F1₁₋₁₂₈.

	Volume de culture	DO d'induction	Température d'induction	Temps d'induction	Quantité de protéine purifiée
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normale	800 ml	0,4	37°C	4 heures	1,2 mg
POU1F1 ₁₋₁₂₈ P76L	1 L	0,1-0,2	25°C	4 heures	2 µg
POU1F1 ₁₋₁₂₈ T75N	1 L	0,1-0,2	37°C	5 heures	440 µg

Tableau 10 : Conditions de production des protéines POU1F1₁₋₁₂₈ normales et mutées.

Les conditions de production et d'induction sont les mêmes pour les formes POU1F1₁₋₁₁₀. Les rendements obtenus sont également indiqués.

3.3 Purification du TAD de POU1F1

Les culots correspondant à deux litres de culture bactérienne de POU1F1₁₋₁₂₈ normale ont été resuspendus dans 50 ml de tampon A (50 mM NaCl, 10 mM HEPES pH7.5, 3 mM 2-mercaptoéthanol, 0,1 mM benzamidine, 0,1 mM PMSF) et lysés par sonication (**Figure 19**, Etape 2).

Après centrifugation, le surnageant a été chargé sur une colonne contenant 2 ml de résine de nickel ayant une forte affinité pour l'histidine (résine Talon, Clontech) (**Figure 19**, Etape 3). La résine a été précédemment lavée avec 50 ml de tampon A

puis avec 50 ml de tampon A supplémenté de 10 mM d'imidazole pour empêcher les liaisons aspécifiques sur la résine. Après lavage de la résine avec un flux de tampon A, 10 mM imidazole, les protéines sont éluées avec du tampon A contenant 125 mM d'imidazole. Différentes fractions sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide 16% pour identifier les fractions d'intérêt. Ces fractions sont ensuite regroupées et dialysées contre un tampon contenant 50 mM de NaCl, 10 mM HEPES pH7.5, 3 mM 2-mercaptoéthanol, 0,1 mM benzamidine, 0,1 mM PMSF. L'échantillon dialysé est ensuite chargé sur une colonne contenant 20 ml d'une résine échangeuse d'anions (résine Q-Hiload, Amersham) équilibrée avec du tampon A sans NaCl (**Figure 19**, Etape 3). Les protéines sont éluées avec 15 ml de tampon avec un gradient de 50 à 500 mM NaCl et 1 mM HEPES pH7.5, 3 mM 2-mercaptoéthanol, 0,1 mM benzamidine, 0,1 mM PMSF. Le point isoélectrique de la protéine POU1F1₁₋₁₂₈ étant proche de 7, les fractions d'intérêt font partie des premières récupérées. Cette étape de purification permet l'élimination d'un certain nombre de contaminants.

Les fractions précédentes sont regroupées et chargées sur une résine d'exclusion (Superdex 75-HR, Amersham) permettant l'obtention d'une protéine hautement purifiée (**Figure 19**, Etape 3).

Les dernières fractions de protéines purifiées sont concentrées entre 4 et 5 mg/ml avec les colonnes de concentration selon les recommandations du fournisseur (Millipore). La concentration des protéines est déduite de l'absorbance A_{280} mesurée par nanodrop.

3.4 Cristallisation

Les conditions de cristallisation ont été réalisées par la technique dite de la « goutte assise » c'est-à-dire par diffusion en phase vapeur [Jancarik et al., 2004]. Une goutte, composée d'un volume de protéine purifiée en solution et d'un volume d'agent précipitant, est placée au dessus d'un réservoir contenant l'agent précipitant. Un état de sursaturation s'établit dans la goutte conduisant à une lente évaporation de l'agent précipitant, entraînant une augmentation de la concentration en protéine et dans certains cas, sa cristallisation.

Pour cristallographier une protéine, il est nécessaire d'identifier les agents précipitants les plus favorables à la cristallisation de la protéine d'intérêt. Pour cela, les différentes constructions du TAD de POU1F1 (POU1F1₁₋₁₂₈ (normale et mutées) et POU1F1₁₋₁₁₀ (normale et mutées)) ont été placées, de manière automatisée, en présence des agents précipitants des kits de cristallisation Crystal Screen (1&2) (Annexe II), Salt RX (Annexe III), Index (Annexe IV), Natrix (Annexe V) (Hampton Research), ProComplex (Annexe VI), PEG Suite (Annexe VII) (Qiagen). L'automatisation a été réalisée sur deux types de robots : le robot TECAN capable de faire des microgouttes de cristallisation de 2 µl total (soit environ 4 µg de protéines purifiées) et sur le robot Mosquito capable de réaliser des nanogouttes de 300 nl total (soit 0,6 µg de protéines purifiées) (**Figure 19**, Etape 4).

La composition de chacun de ces kits commerciaux d'agents précipitants a été déterminée de manière empirique pour favoriser la cristallisation. Les protéines ont été placées à 4°C et observées régulièrement au microscope. Les cristaux obtenus ont été congelés dans une solution cryoprotectante, compatible avec l'agent précipitant dans lequel était la protéine, puis congelés directement dans l'azote liquide. Les cristaux ont ensuite été analysés sur une ligne de rayonnement synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière Energie Intermédiaire du LURE) (Gif-sur-Yvette, France).

RESULTATS

1. Analyse de gènes candidats pour les maladies de la croissance

Les déficits en hormone de croissance ont une présentation très hétérogène. En effet, ils peuvent survenir de manière sporadique, ou bien être familiaux, la transmission se faisant selon un mode autosomique dominant ou récessif ou bien encore selon une transmission liée à l'X. Par ailleurs, le déficit en hormone de croissance peut être isolé ou combiné à un déficit en une ou plusieurs des autres hormones antéhypophysaires et peut également être associé à des anomalies extra-pituitaires (formes syndromiques).

Comme cela a été détaillé précédemment, un nombre important de facteurs de transcription intervient à la fois dans la mise en place et le développement de l'antéhypophyse ainsi que dans le bon fonctionnement de l'axe somatotrope.

Dans la majorité des cas, les patients n'ont pas de défauts moléculaires identifiés, une approche « gènes candidats » est ici utilisée et consiste à analyser un gène potentiellement impliqué dans une pathologie chez une cohorte de patients présentant un phénotype proche de celui observé dans les modèles d'invalidation chez la souris. En absence de modèle d'invalidation génique, l'expression spatio-temporelle des gènes peut orienter le choix d'un gène candidat et permettre de constituer une cohorte dont le phénotype des patients serait compatible avec son expression.

Une autre approche consiste en l'analyse de gènes qui interagissent avec des facteurs de transcription déjà impliqués dans les pathologies de la croissance (analyse de données d'interactome).

Deux gènes candidats seront présentés dans cette partie, *SIX6* et *LHX2*.

D'autre part, la recherche d'anomalies génétiques au sein du gène *LHX3* réalisée dans un but de diagnostic a permis l'identification de deux nouvelles mutations. L'effet de ces mutations a été étudié et sera exposé dans ce chapitre.

1.1 Recherche de mutations du gène *SIX6*

SIX6 code pour un facteur de transcription à domaine SIX (SD ou *SIX Domain*) et est situé sur le chromosome 14 en q22.

Les six membres de la famille d'homéoprotéines SIX présentent deux domaines hautement conservés :

- le domaine SIX impliqué dans les interactions protéine-protéine et ADN-protéine
- l'homéodomaine [Kawakami et al., 2000].

En dehors de ces deux domaines, les parties N-terminale et C-terminale ne semblent pas avoir de fonctions particulières, bien que leurs séquences en acides aminés soient très conservées au cours de l'évolution (**Figure 20**).

Au cours du développement de la souris, *Six6* est exprimé principalement dans l'œil et la glande pituitaire (**Figure 21**). Les analyses d'hybridation *in situ* montrent une forte expression de *Six6* dans la rétine, avec un pic à e13.5 puis une diminution progressive de son expression. Au niveau de la glande pituitaire et dès les stades précoces d'apparition de la poche de Rathke, l'expression de *Six6* se fait selon un gradient dorso-ventral avec une expression persistante dans les cellules périluminaires en prolifération et réduite dans les cellules différenciées [Lopez-Rios et al., 1999; Li et Rosenfeld, 2002]. L'expression de *Six6* est retrouvée dans tous les contingents cellulaires anté-hypophysaires et persiste également à l'âge adulte dans l'antéhypophyse et dans l'œil.

Il a été montré que la protéine *Six6* est un régulateur transcriptionnel qui interagit directement avec la protéine co-répresseur *Tle1* (membre de la famille des répresseurs *Groucho*) et *Dach1* (*Dashung homolog 1*) au niveau de l'œil [Li et Rosenfeld, 2002; Toy et Sundin, 1999; Lopez-Rios et al., 1999]. *Six6* interagit fortement avec *Dach1* et régule la prolifération par répression directe des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines incluant *p27Kip1* qui est lui-même un inhibiteur de la prolifération des cellules rétiniennes [Toy et Sundin, 1999].

Des analyses de délétions ont montré que les domaines SD ainsi que l'homéodomaine sont requis pour permettre cette activité répressive et cela par l'intermédiaire de séquences cibles appelés SE (*Six Response Element*) [Li et Rosenfeld, 2002]. Deux sites de liaison à *Six6* sont retrouvés au niveau du

promoteur de *p27Kip1* suggérant que ce gène est une cible directe de *Six6* [Kwon et al., 1996].

Dans l'œil en développement, la surexpression de *Six6* cause une augmentation drastique de la taille de l'œil [Zuber et al., 1999], et l'expression ectopique de *Six6* induit le développement de tissu oculaire ectopique [Bernier et al., 2000]. Chez le xénope, *Six6* paraît agir en amont d'autres gènes impliqués dans le développement de l'œil tels que *Pax6*, *Rx/Rax* et *Six3* [Zuber et al., 2003].

SIX6_Homo_sapiens	1	-----MFQLPILN
SIX6_Canis_familiaris	1	GAVEPPQLAGQCVPAALSRFTEESLAHPARPAGICCASRSALSVPVAVGTASMFQLPILN
SIX6_Mus_musculus	1	-----MFQLPILN
SIX6_Gallus_gallus	1	-----MFQLPILN
SIX3_Homo_sapiens	1	GAGGGSGGGNGAGGGGAG-----GAGGGGGGSRAPPEE-----LSMFQLPTLN
SIX1_Homo_sapiens	1	-----MSMLPSFG
SIX2_Homo_sapiens	1	-----MSMLETFG
SIX4_Homo_sapiens	1	PAPFPLEPGDAATAAARVSGEEGAVAAAAAGAAADQVQLHSELLGRHHHAAAAAAQTFLA
consensus	1	mfqlpiln

SIX6_Homo_sapiens	9	FSPQQVAGVCETLEESGDVERLGRFLWSLPVAPAACEALNKNESVLRARAIVAFHCGNYR
SIX6_Canis_familiaris	61	FSPQQVAGVCETLEESGDVERLGRFLWSLPVAPAACEALNKNESVLRARAIVAFHCGNYR
SIX6_Mus_musculus	9	FSPQQVAGVCETLEESGDVERLGRFLWSLPVAPAACEALNKNESVLRARAIVAFHCGNYR
SIX6_Gallus_gallus	9	FSPQQVAGVCETLEESGDVERLGRFLWSLPVAPAACEALNKNESVLRARAIVAFHCGNYR
SIX3_Homo_sapiens	45	FSPEQVASVCETLEETGDIERLGRFLWSLPVAPGACEALNKHESILRARAVAFHTGNFR
SIX1_Homo_sapiens	9	FTQEQVACVCEVLQQGGNIERLGRFLWSLP----ACDHLHKNESVLKAKAVVAFHGRGNER
SIX2_Homo_sapiens	9	FTQEQVACVCEVLQQGGNIERLGRFLWSLP----ACEHLHKNESVLKAKAVVAFHGRGNER
SIX4_Homo_sapiens	61	FSPDHVACVCEALQQGGNLDRLARFLWSLP----QSDILRGNESILKARALVAFHCGTYP
consensus	61	FspqqVagVCeTLeesGdveRLgRFLWSLPvapaacealnknESvLrArAiVAFH Gnyr

SIX6_Homo_sapiens	69	ELYHIENHKFTKESHAKLQALWLEAHYQEAELRGRPLGPVDKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX6_Canis_familiaris	121	ELYHIENHKFTKESHAKLQALWLEAHYQEAELRGRPLGPVDKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX6_Mus_musculus	69	ELYHIENHKFTKESHAKLQALWLEAHYQEAELRGRPLGPVDKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX6_Gallus_gallus	69	ELYHIENHKFTKESHGKLQALWLEAHYQEAELRGRPLGPVDKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX3_Homo_sapiens	105	DLYHIENHKFTKESHGKLQAMWLEAHYQEAELRGRPLGPVDKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX1_Homo_sapiens	65	ELYKILESHQFSFPHNHFKLQQLWLKAHYVEAEKLGRPLGAVGKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX2_Homo_sapiens	65	ELYKILESHQFSFPHNHAKLQQLWLKAHYIEAEKLGRPLGAVGKYRVRKKFPLPRTIWDG
SIX4_Homo_sapiens	117	ELYSILESHSFESEANHPILQQLWYKARYTEAERARGRPLGAVDKYRIRKKFPLPRTIWDG
consensus	121	eLYhILeNhKfTkesHakLqalWleAhYqEAEklRGRPLGpVdKYRvRkKfPLPrtIWDG

SIX6_Homo_sapiens	129	EQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRRQRDR----
SIX6_Canis_familiaris	181	EQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRRQRDR----
SIX6_Mus_musculus	129	EQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRRQRDR----
SIX6_Gallus_gallus	129	EQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRRQRDR----
SIX3_Homo_sapiens	165	EQKTHCFKERTRSLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRRQRDR----
SIX1_Homo_sapiens	125	EETSYCFKEKSRGVLREWYAHNPYPSPREKRELAETGLTTTQVSNWFKNRRQRDR----
SIX2_Homo_sapiens	125	EETSYCFKEKSRSVLREWYAHNPYPSPREKRELAETGLTTTQVSNWFKNRRQRDR----
SIX4_Homo_sapiens	177	EETVYCFKEKSRNALKELYKQNRYPSPAERHLAKITGLSITQVSNWFKNRRQRDRNPSE
consensus	181	EqkthCFKErtRhllrEwYlqdpYPnpskKReLaqATGLtpTQVgNWfKNRRQRDR

SIX6_Homo_sapiens	185	-----AAAANKRLQQQVLS-----
SIX6_Canis_familiaris	237	-----AAAANKRLQQQVLS-----
SIX6_Mus_musculus	185	-----AAAANKRLQQQVLS-----
SIX6_Gallus_gallus	185	-----AAAANKRLQQQVLA-----
SIX3_Homo_sapiens	221	-----AAAANKRLQHQAIG-----
SIX1_Homo_sapiens	181	-----AAEAKERENTENNNSSSNKQ-----NQLSPL
SIX2_Homo_sapiens	181	-----AAEAKERENNENSNSNSHN-----PL
SIX4_Homo_sapiens	237	TQSKSESDGNPSTEDESSKGHEDLSPHPLSSSSDGITNLSLSSHMEPVYMQQIGNAKISL
consensus	241	aaaaknrlqqqvls

Figure 20 : Alignement de la séquence en acides aminés de SIX6 de plusieurs espèces et des autres membres de la famille SIX. Les domaines SD (acides aminés 12 à 126, ligne gris clair) et HD (acides aminés 127 à 186, ligne gris foncé) de SIX6 sont fortement conservés au cours de l'évolution.

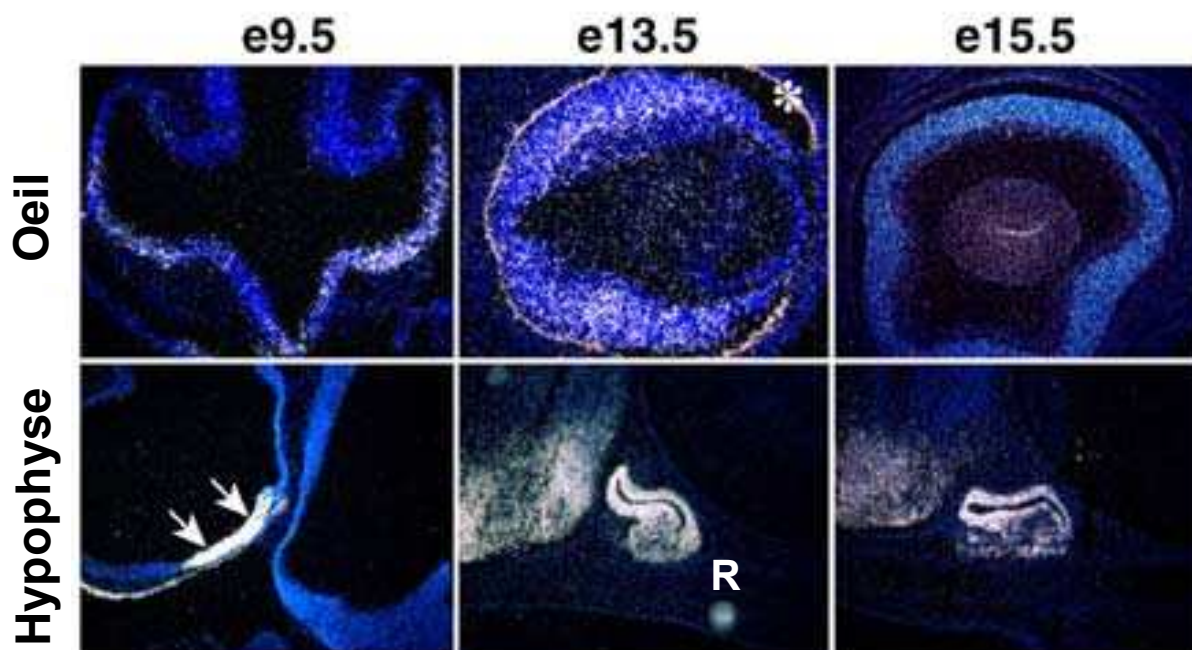


Figure 21 : Expression de *Six6* chez la souris au cours du développement de la rétine et de la glande pituitaire. L'ARN *Six6* est détecté par hybridation *in situ* à E9.5, E13.5, E15.5.

R : poche de Rathke

([Li et Rosenfeld, 2002], supplemental data figure 1A)

Bien que *Six6* ne semble pas essentiel à la survie, les souris *Six6*^{-/-} montrent une glande pituitaire hypoplasique, un degré variable d'hypoplasie rétinienne, avec souvent absence de chiasma et de nerfs optiques. Chez ces souris, les analyses avec des marqueurs spécifiques des cellules antéhypophysaires, révèlent la présence de tous les types cellulaires qui sont néanmoins diminués en nombre [Li et Rosenfeld, 2002]. L'expression de *Six6* dans l'œil et dans la glande pituitaire en développement suggère que des mutations dans ce gène pourraient altérer ces deux structures.

Des rares délétions chromosomiques *de novo* hétérozygotes dans la région 14q22-q23 (**Tableau 11**) ont été identifiées chez l'homme (7 cas rapportés depuis 1991, **Figure 22**), et impliquent un défaut complet dans le développement de l'œil et des défauts pituitaires. Dans cette région, trois gènes pourraient être impliqués dans le développement de l'œil et de la glande pituitaire : *BMP4*, *OTX2* et *SIX6*. Ces

patients présentent un déficit antéhypophysaire variable, une antéhypophyse aplasique ou hypoplasique, une post-hypophyse ectopique ou normale ainsi que des défauts oculaires correspondant aux anomalies phénotypiques observées chez les souris invalidées pour *Six6*.

Chez l'homme, des mutations ont été identifiées dans les gènes *BMP4* et *OTX2*. Les mutations de *BMP4* conduisent à des anomalies oculaires (anophtalmie, microphthalmie, colobome), des anomalies de la ligne médiane, une hypoplasie rénale, une polydactylie ou un déficit en hormone de croissance [Bakrania et al., 2008]. Les mutations de *OTX2* ont été retrouvées chez des patients présentant des phénotypes variables comprenant essentiellement des malformations oculaires, un déficit en hormone de croissance (IGHD ou CPHD), une hypoplasie antéhypophysaire et la post-hypophyse peut être ectopique [Prince et al., 2011].

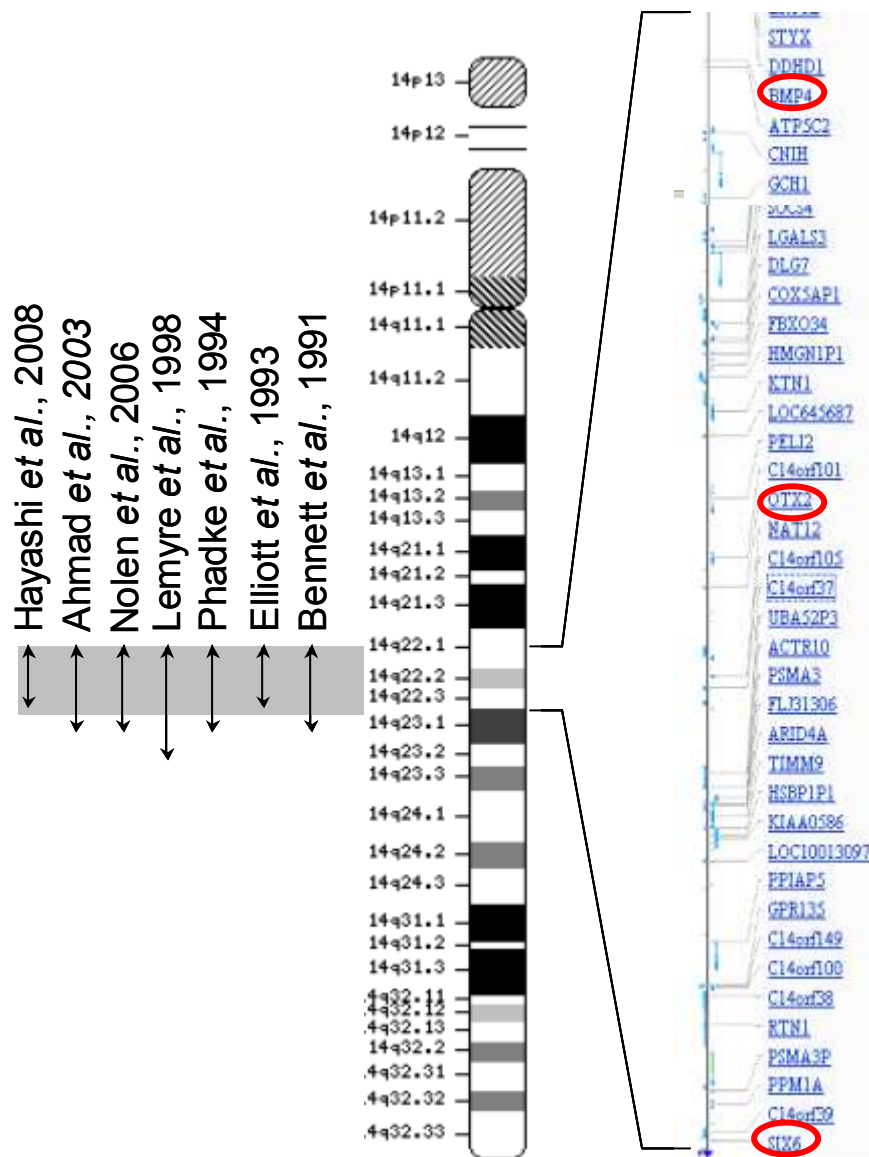


Figure 22 : Régions du chromosome 14 délétées décrites dans la littérature chez des patients présentant un déficit hypophysaire et des anomalies oculaires. Les doubles flèches (à gauche) indiquent les délétions et la zone grisée représente la région commune à tous les patients. Les gènes présents dans cette région sont détaillés (à droite). Les gènes connus pour leur implication dans le développement de l'œil et de la glande pituitaire sont entourés en rouge.

Tableau 11 : Comparaison des phénotypes des patients décrits dans la littérature avec délétion hétérozygotes emportant *SIX6* et phénotype du modèle murin invalidé pour *Six6*.

ND : Non décrit ; - : absence ; + : présence

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5	Cas 6	Cas 7	Modèle murin
Anophtalmie bilatérale	+	+	+	+	+	+	+	-
Absence de nerfs optiques et chiasma	+	ND	ND	+	+	-	-	Souvent
Anomalies pituitaires anatomiques	Antéhypophyse aplasique	ND	ND	Antéhypophyse hypoplasique	Antéhypophyse aplasique et post-hypophyse ectopique	-	-	Antéhypophyse hypoplasique
Anomalies pituitaires fonctionnelles	ND	Hypothyroïdisme, hypogonadisme	ND	-	Déficit GH	-	+	ND
Retard psychomoteur	ND	+	ND	+	ND	-	+	ND
Anomalies pied/main	Clinodactylie	-	-	-	ND	Polydactylie	Polydactylie (pied)	ND
Autres anomalies	Développement anormal du système auditif						Opacité des cornées	Hypoplasie rétinienne

Cas 1 [Bennett et al., 1991] ; Cas 2 [Elliott et al., 1993] ; Cas 3 [Phadke et al., 1994] ; Cas 4 [Lemyre et al., 1998] ; Cas 5 [Nolen et al., 2006] ; Cas 6 [Ahmad et al., 2003] ; Cas 7 [Hayashi et al., 2008] ; Modèle murin [Li et Rosenfeld, 2002].

A ce jour, trois études de recherche de mutations de *SIX6* ont été publiées. Elles concernent des cohortes de patients présentant des anomalies oculaires telles que anophtalmie, microphthalmie et colobome sans déficit en hormones pituitaires rapporté [Zhang et al., 2002; Gallardo et al., 2004; Aijaz et al., 2004]. Des variations faux-sens décrites comme étant des polymorphismes ont été rapportées mais aucune mutation causale n'a encore été identifiée.

L'analyse de *SIX6* dans une cohorte de patients présentant un phénotype proche de celui observé chez la souris (anomalies pituitaires et oculaires) a été réalisée.

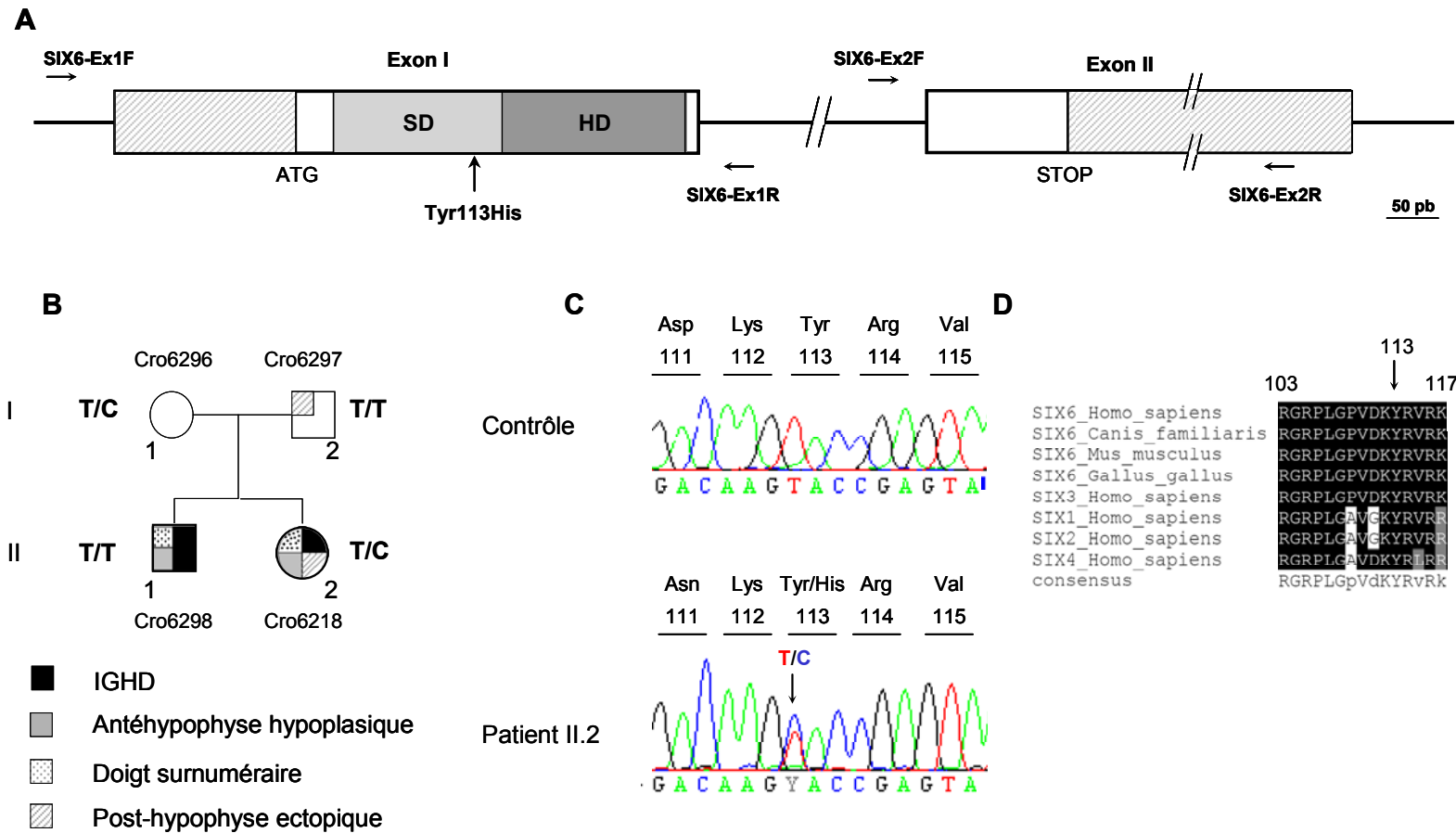


Figure 23 : Variation faux-sens identifiée à l'état hétérozygote dans une famille dont le cas index (Cro6218) présente un déficit isolé en hormone de croissance, avec posthypophyse ectopique et antéhypophyse hypoplasique. A, Schéma du gène *SIX6* sur lequel est indiquée la position de l'acide aminé 113 (variation identifiée). B, Arbre généalogique de la famille de la patiente Cro6218 (II.2). La mère de la patiente (I1) est porteuse de la même variation, le frère (II1) qui est aussi atteint d'un déficit isolé en GH mais sans anomalie de la posthypophyse, ne présente pas cette variation. C, Séquences nucléotidiques des allèles *SIX6* contrôle (en haut) et de la patiente (en bas). La mutation de la thymine 337 en cytosine conduit au remplacement de la tyrosine 113 en histidine. D, L'alignement du domaine peptidique concerné montre une grande conservation de la tyrosine 113, non seulement entre les espèces mais également au sein de la famille SIX.

Résultats

Selon les études d'expression de *Six6*, des mutations au sein de ce gène pourraient expliquer le phénotype des patients de notre cohorte présentant un retard de la croissance associé à des anomalies oculaires. 82% de ces patients présentent des anomalies dans la morphologie de la glande pituitaire (aplasie ou hypoplasie de l'antéhypophyse et/ou post-hypophyse ectopique). Les ADN d'une cohorte de 74 patients ont donc été analysés pour ce gène.

L'analyse des deux exons de *SIX6* (**Figure 24**) a permis d'identifier deux nouvelles variations hétérozygotes, la variation silencieuse c.18C>T (p.Ile6Ile) et la variation faux-sens c.337T>C (p.His113Tyr).

L'histidine 113 est un acide aminé du domaine SD très conservé au cours de l'évolution mais aussi au sein de la famille SIX (**Figure 23D**).

La variation faux-sens c.337T>C (*SIX6* p.His113Tyr) a été identifiée chez une patiente (II2, **Figure 23B**), née d'une union non consanguine (I1 et I2), et qui présente un déficit isolé en hormone de croissance et un doigt surnuméraire. L'imagerie par résonance magnétique a révélé une post-hypophyse ectopique, une interruption de la tige pituitaire, une antéhypophyse hypoplasique, une anomalie du corps calleux et une malformation d'Arnold Chiari. Cette patiente était initialement décrite comme ayant une anomalie oculaire (non précisée) mais n'en présente finalement aucune.

Le frère (II1) présente également un déficit en GH, un doigt surnuméraire, une interruption de la tige pituitaire, une antéhypophyse hypoplasique et un corps calleux aminci. La variation *SIX6* c.337T>C (p.His113Tyr) n'a pas été retrouvée chez ce garçon ni chez leur père qui présente, comme les deux enfants, un doigt surnuméraire. En revanche, la variation *SIX6* c.337T>C (p.His113Tyr) a également été retrouvée chez la mère de la patiente qui est de phénotype normal.

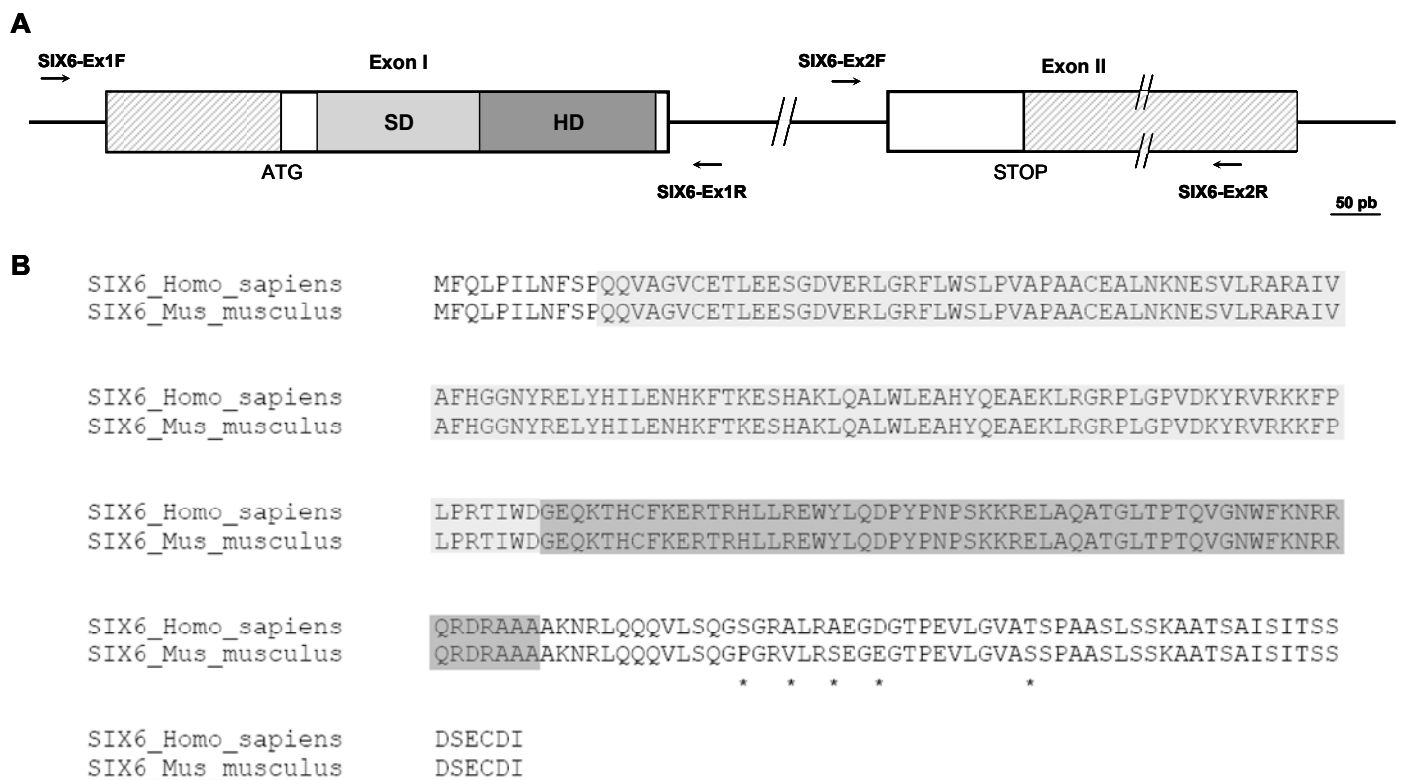


Figure 24 : Organisation génomique de *SIX6* humain et murin et séquence en acides aminés. A, Représentation schématique du gène *SIX6*. *SIX6* est composé de deux exons (I et II) représentés par des rectangles. Les domaines SIX (SD) et l'homéodomaine (HD) sont représentés en gris clair et gris foncé respectivement. Les localisations du codon d'initiation de la transcription (ATG) et du codon STOP (TGA) sont indiquées. Les flèches indiquent la position des oligonucléotides utilisés pour l'amplification (voir tableau 6). Les exons sont représentés à l'échelle. B, Comparaison des séquences en acides aminés des protéines *SIX6* humaine et murine. Les résidus qui diffèrent sont indiqués par un astérisque. Les domaines SIX et l'homéodomaine sont représentés en gris clair et gris foncé respectivement.

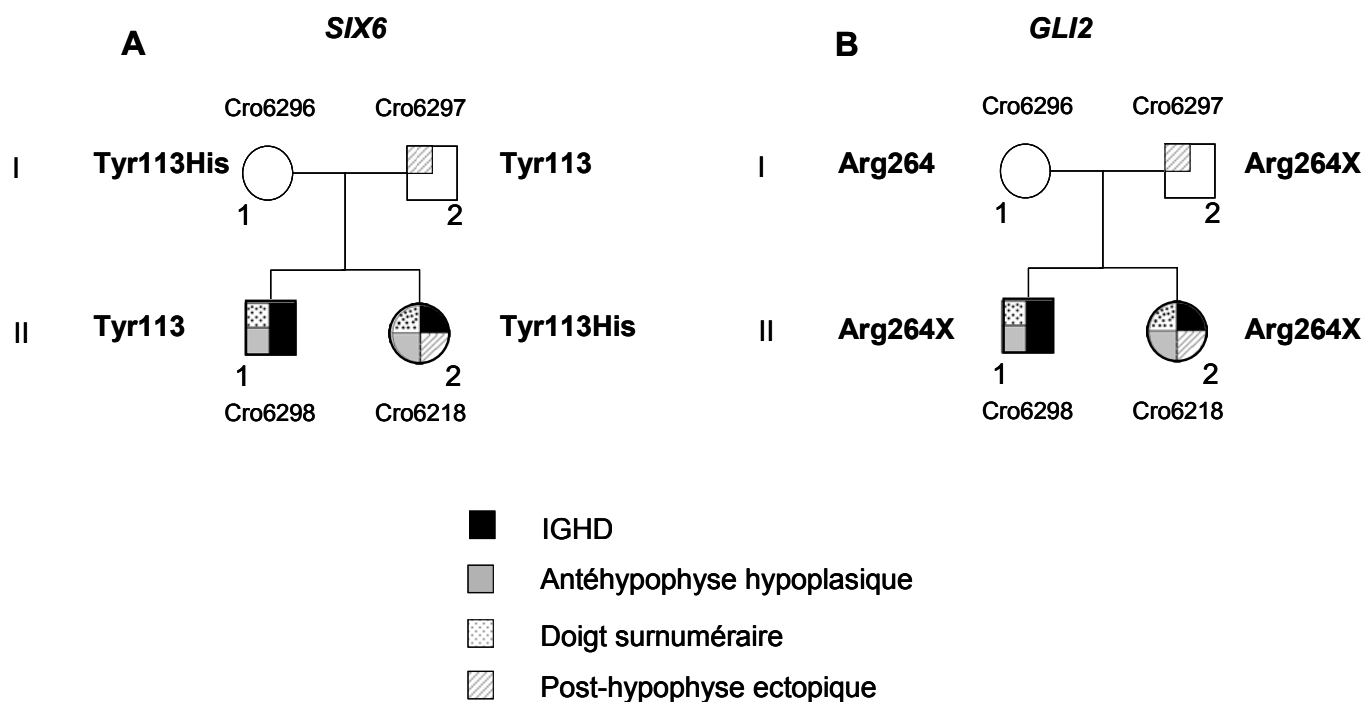


Figure 25 : Ségrégation des mutations *SIX6* (A) et *GLI2* (B) identifiées. Chez cette famille, le cas index (II2) présente un IGHD, une antéhypophyse hypoplasique et un doigt surnuméraire. Seul le frère (II1) présente un phénotype proche. Le père (I2) présente également un doigt surnuméraire sans déficit hypophysaire rapporté.

Discussion

Le développement de la glande pituitaire comme celui de l'œil implique des processus complexes. Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent jouer un rôle dans la malformation ou le dysfonctionnement de ces structures [Li et Rosenfeld, 2002]. Bien que plusieurs mutations aient été identifiées dans des gènes intervenant au cours du développement de la glande pituitaire, la majorité des cas reste inexpliquée.

L'expression de *Six6* dans la glande pituitaire et dans l'œil, en développement et à l'âge adulte, suggère fortement que des mutations de ce gène pourraient induire des anomalies oculaire et/ou pituitaire. Cette hypothèse est confortée par l'existence, en pathologie humaine, de phénotype proche de celui de la souris invalidée, chez des patients présentant des délétions dans la région 14q22-q23 qui inclue *SIX6* [Bennett et al., 1991; Elliott et al., 1993; Phadke et al., 1994; Lemyre et al., 1998; Nolen et al., 2006; Ahmad et al., 2003; Hayashi et al., 2008].

Lors de cette étude, la variation c.337T>C (p.His113Tyr) a été retrouvée chez une patiente atteinte d'un déficit en GH et une antéhypophyse hypoplasique. La conservation absolue de la tyrosine à cette position et la substitution en histidine suggère que cette mutation est pathogène (substitution d'un acide aminé polaire en acide aminé basique). Or, la mère de la patiente est aussi porteuse de cette variation à l'état hétérozygote sans phénotype associé ce qui pourrait suggérer que cette mutation est de pénétrance incomplète. Cependant, l'absence de ségrégation avec le phénotype pathologique (mère saine porteuse et frère malade non porteur) démontre que cette variation n'est pas causale (**Figure 25A**).

Depuis, au laboratoire, une nouvelle mutation du gène *GLI2*, c.790 C>T (p.Arg264X), a été identifiée chez cette patiente. Cette mutation ségrège parfaitement avec la présence d'un doigt surnuméraire puisqu'elle a également été retrouvée chez le père et le frère du cas index et pourrait être d'expressivité variable (**Figure 25B**). Comme *Six6*, *Gli2* est exprimé au cours du développement embryonnaire dans la poche de Rathke (e11,5) et dans l'œil [Hui, 1994]. Bien que la variation *SIX6* c.337T>C ne semble pas être la cause de la maladie, il est envisageable que cette variation soit tout de même impliquée dans le phénotype de la patiente. En effet, le père (doigt surnuméraire) et le frère (IGHD, antéhypophyse hypoplasique, corps calleux aminci, doigt surnuméraire) du cas index sont porteurs

de la mutation *GLI2* c.790 C>T (p.Arg264X), or le phénotype de la patiente est plus sévère (IGHD, antéhypophyse hypoplasique, post-hypophyse ectopique, interruption de la tige pituitaire, anomalie du corps calleux, Arnold Chiari). Bien qu'aucune étude ne montre un lien entre *SIX6* et *GLI2*, il est envisageable que ces deux protéines interagissent (directement ou non) et que la présence de deux variations faux-sens sur ces gènes entraînerait une aggravation du phénotype.

Dans la maladie de Bardet-Biedl, une hérédité triallélique (famille des gènes BBS) a été montrée dans quelques rares familles [Katsanis, 2004; Beales et al., 2003]. Il est donc envisageable que la variation *SIX6* c.337T>C (p.His113Tyr) associée à la mutation *GLI2* c.790 C>T (p.Arg264X) conduise au phénotype observé chez le cas index. Des expériences de co-transfection de *SIX6* et/ou *GLI2* normal et muté pourraient permettre de comprendre les effets de ces mutations sur des promoteurs pituitaires cibles.

Aucune autre mutation clairement pathologique n'a pu être identifiée dans cette cohorte, suggérant que, si elles existent, les mutations du gène *SIX6* sont des causes de déficit en hormones hypophysaires extrêmement rares.

Dans cette étude, une recherche de mutation a été effectuée sur le gène *SIX6*, or la région 14q22-q23 délétée chez les patients décrits dans la littérature comporte un certain nombre de gènes dont *BMP4* et *OTX2*, il est donc possible que l'un de ces deux gènes ou un autre gène délété de cette région soit impliqué dans le phénotype des patients.

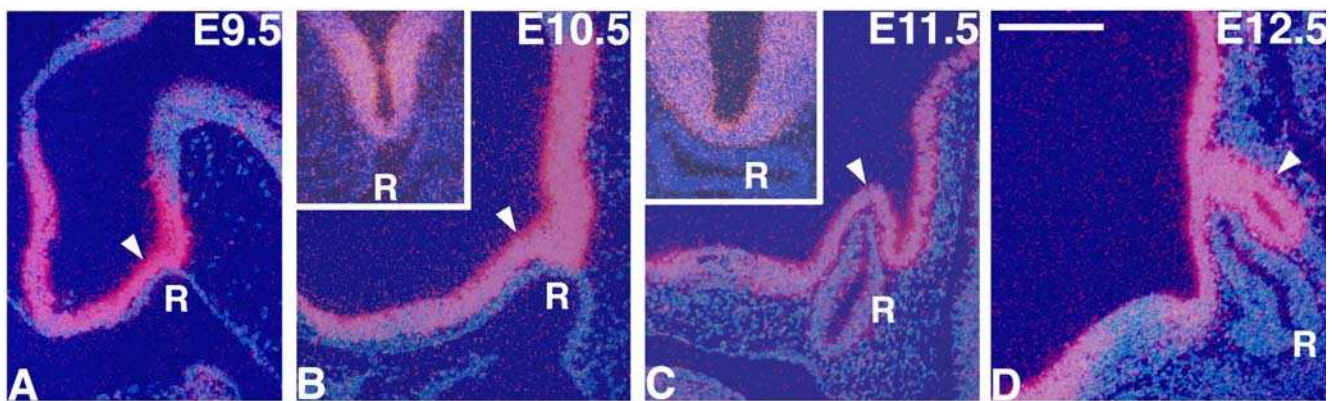


Figure 26 : Expression de *Lhx2* chez la souris au cours du développement de la glande pituitaire. L'ARNm de *Lhx2* est détecté par hybridation *in situ* à E9.5 (A), E10.5 (B), E11.5 (C), et E12.5 (D). Les têtes de flèches en A et B indiquent l'expression de *Lhx2* dans l'infundibulum en contact avec la poche de Rathke (R) en développement. Les têtes de flèche indiquent, en C, l'évagination du neuroectoderme du diencéphale ventral et en D, la posthypophyse. L'expression de *Lhx2* est limitée au neuroectoderme (A-C) et à la posthypophyse (D). [Zhao et al., 2010].

1.2 Recherche de mutations du gène *LHX2*

LHX2 est une protéine membre de la famille LIM constituée d'un homéodomaine et de deux domaines LIM en doigts de zinc, ceux-ci sont impliqués dans les interactions protéine-protéine et peuvent moduler la fonction de l'homéodomaine.

Chez la souris, il a été montré que ce gène était exprimé au cours du développement de la glande pituitaire, notamment de la post-hypophyse (**Figure 26**), et de l'œil (**Figure 27**) [Porter et al., 1997; Zhao et al., 2010]. Avant la naissance, *Lhx2* est exprimé à travers la neurorétine alors qu'après la naissance, l'expression de *Lhx2* est limitée à la couche nucléaire interne de la rétine [Xu et al., 1993; Yun et al., 2009]. Les modèles de souris *Lhx2*^{-/-} ont permis d'impliquer *Lhx2* dans la régulation des cellules hépatiques qui inhiberait le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire causant une fibrose du foie [Wandzioch et al., 2004], dans le développement des neurones olfactifs [Hirota et Mombaerts, 2004] et c'est un régulateur important dans la croissance du poil [Rhee et al., 2006; Törnqvist et al., 2010]. Des hybridations *in situ* ont également montré le rôle de *Lhx2* dans l'érythropoïèse définitive [Dahl et al., 2008; Kitajima et al., 2011].

Les souris *Lhx2*^{-/-} meurent précocement à e13,5. Cette invalidation fonctionnelle entraîne une diminution de la taille du cortex cérébral, une absence des lobes postérieur et intermédiaire de la glande pituitaire, un défaut d'organisation de l'antéhypophyse (**Figure 28**) et une anophtalmie (**Figure 29**) [Porter et al., 1997; Zhao et al., 2010]. Les souris développent également une fibrose hépatique et l'érythropoïèse est incomplète ce qui conduit à la mort précoce des embryons en rapport avec une anémie sévère [Porter et al., 1997; Wandzioch et al., 2004]. Les souris *Lhx2*^{+/-} sont phénotypiquement normales.

Ces résultats suggèrent que *Lhx2* est important dans le développement de l'œil mais aussi de la post-hypophyse et de l'érythropoïèse définitive et est impliqué dans le développement antéhypophysaire [Porter et al., 1997; Zhao et al., 2010].

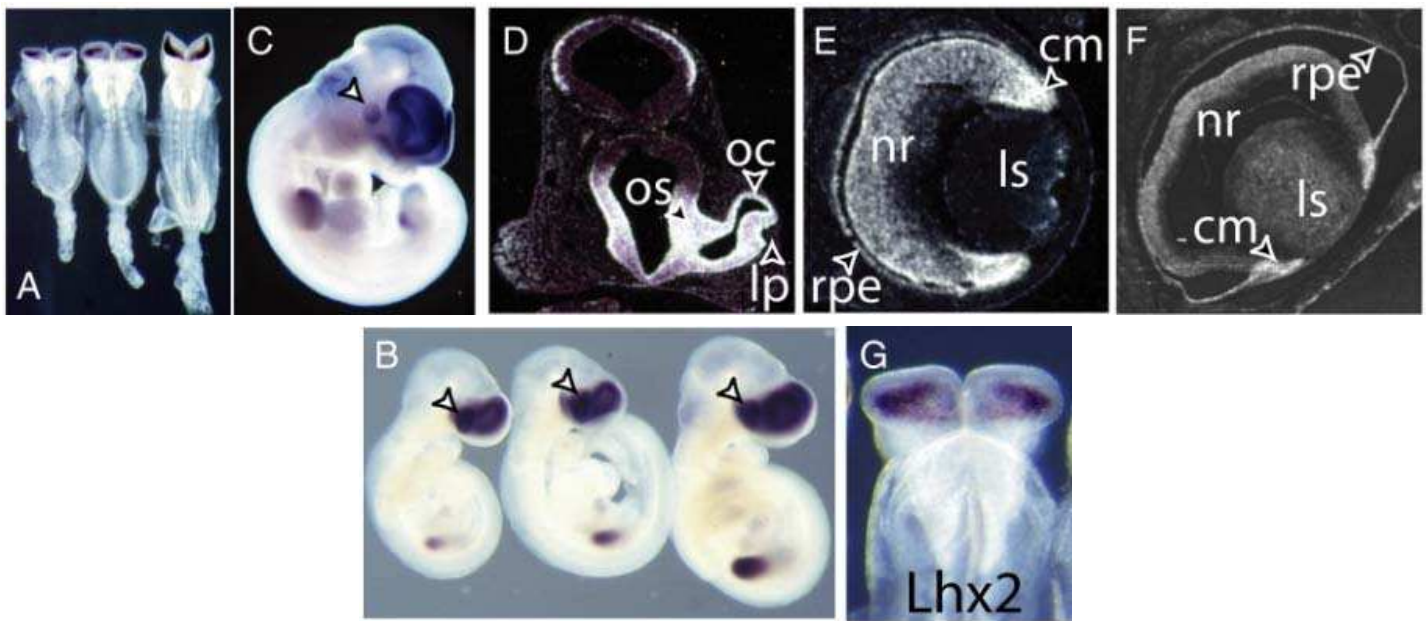


Figure 27 : *Lhx2* est exprimé dans l'œil et délimite le champ de la rétine. (A-C) Les hybridations *in situ* sur embryons entiers montrent que l'expression de *Lhx2* est détectable au niveau de la plaque neurale antérieure des embryons de souris dès le stade 2 somites (A), dans la vésicule optique (flèche), la vésicule télencéphalique et les membres dès e9.0 (B), et dans l'œil (flèche), le néocortex et les bourgeons membranaires à e12.5 (C). (D-F). L'expression robuste de *Lhx2* est détectée dans la cupule optique (oc) et la tige optique (os) à e10.5, dans l'épithélium pigmentaire rétinien (rpe), la neuro-rétine centrale (nr) et la zone marginale ciliaire de la rétine (cm) à e13.5 et e17.5. Aucune expression n'est détectable dans la placode du cristallin (lp) et le cristallin (ls). (G) Au stade 2 somites, l'expression de *Lhx2* démarque une région spécifique de la plaque neurale antérieure correspondant au champ rétinien présomptif [Tétreault et al., 2009].

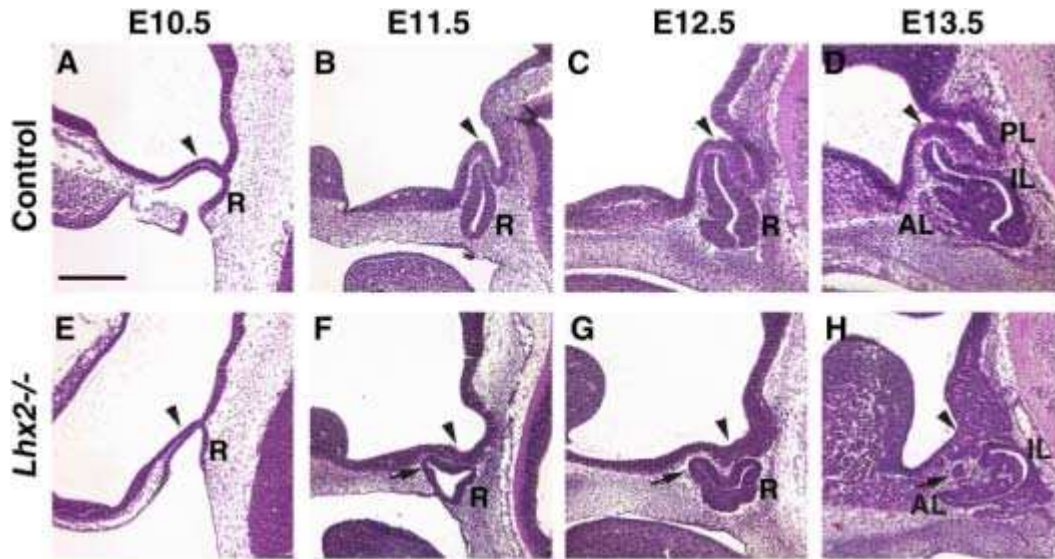


Figure 28 : Défauts morphologiques de la glande pituitaire chez les souris mutantes invalidées pour *Lhx2*. Les sections sagittales contrôles (A-D) et invalidées (E-H) ont été colorées par l'éosine et l'hématoxyline. La tête de flèche (A-H) indique le pôle dorsal de la glande pituitaire. Contrairement aux embryons contrôles, les embryons *Lhx2*^{-/-} présentent une absence d'évagination du neuroectoderme nécessaire à la formation du lobe postérieur de la glande pituitaire (PL). L'invalidation de *Lhx2* n'empêche pas la formation de la poche de Rathke (R) mais plutôt que de s'étendre dorsalement (D), la poche de Rathke croît ventralement dans la lumière, résultant en un lobe antérieur (AL) et intermédiaire (IL) de la glande pituitaire morphologiquement altérés (flèches en F, G et H). L'absence du lobe postérieur est aussi mis en évidence [Zhao et al., 2010].

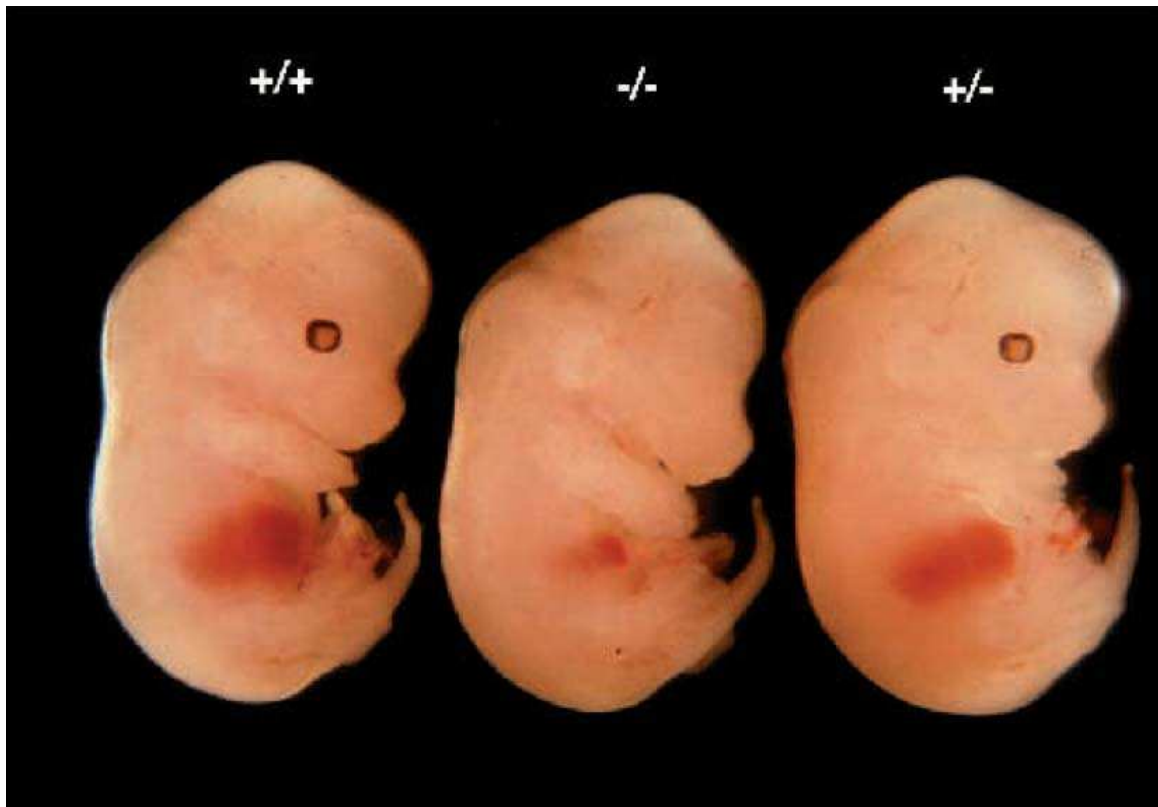


Figure 29 : Comparaison phénotypique d'embryons $Lhx2^{+/+}$, $Lhx2^{+/-}$ et $Lhx2^{-/-}$ à E13.5 issus d'un croisement de deux souris $Lhx2^{+/-}$. Un embryon $Lhx2^{+/+}$ est présenté sur la gauche, un embryon hétérozygote sur la droite et un embryon $Lhx2^{-/-}$ au milieu. L'embryon invalidé pour $Lhx2$ présente une anophtalmie, un aplatissement de la région frontale et un petit foie. Un défaut d'érythropoïèse chez ces embryons mène à un décès *in utero* [Porter et al., 1997].

Les ADN des patients présentant une post-hypophyse ectopique sont séquencés pour *HESX1*, *SOX3* et *OTX2* et les patients présentant des anomalies oculaires sont séquencés pour *HESX1*, *SOX2*, *SOX3* et *OTX2*. Malgré l'implication connue de ces gènes dans les retards de croissance, la grande majorité des cas de patients présentant un retard de croissance associé à des anomalies oculaires reste inexpliquée à ce jour.

Dans cette étude de recherche de mutations de *LHX2*, les ADN de 76 patients indépendants présentant un déficit hypophysaire, une post-hypophyse ectopique ou non visible et des anomalies oculaires ont été séquencés. Les défauts oculaires incluent des anomalies majeures (anophtalmie, microphthalmie, hypoplasie ou aplasie des nerfs optiques, dysplasie septo-optique, colobome (n=59)) et des défauts oculaires mineurs (strabisme, nystagmus, myopie, hypermétropie (n=17)).

Trois variations faux-sens ont été identifiées dont une déjà publiée [Desmaison et al., 2010]. Des tests fonctionnels ont été réalisés *in vitro* par co-transfection de promoteurs pituitaires (*PRL*, *TSH β* , *α GSU* et *POU1F1*) en présence de *LHX2* normal ou muté afin d'étudier l'implication de ces variations dans le phénotype des patients. Deux études précédentes concernant une cohorte de patients présentant une schizencéphalie (malformation cérébrale entraînant des troubles moteurs, une épilepsie et un retard psychomoteur) associée à une dysplasie septo-optique [Mellado et al., 2010] et une cohorte de patients avec anophtalmie ou microphthalmie [Desmaison et al., 2010] n'ont pas permis d'impliquer *LHX2* en pathologie humaine.

Cette étude fait l'objet d'un article soumis à The Journal of Molecular Endocrinology.

Article 1 : Screening of *LHX2* in patients presenting growth retardation with posterior pituitary and ocular abnormalities

Screening of *LHX2* in patients presenting growth retardation with posterior pituitary and ocular abnormalities

Christelle Pérez¹, Florence Dastot-Le Moal², Nathalie Collot², Marie Legendre^{1,2}, Isabelle Abadie³, Anne-Marie Bertrand⁴, Serge Amselem^{1,2} and Marie-Laure Sobrier¹

¹ Inserm U.933, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Hôpital Armand-Trousseau, 75571 Paris, France

² Service de Génétique et d'Embryologie Médicales, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Armand Trousseau, 75571 Paris, France

³ Service de pédiatrie, Centre Hospitalier Intercommunal, 94000 Créteil, France

⁴ Service de pédiatrie 1, Centre Hospitalo-Universitaire, 25000 Besançon, France

Corresponding authors: Marie-Laure Sobrier

marie-laure.sobrier@inserm.fr

Postal Address: Inserm U.933, Hôpital Armand-Trousseau, 75571 Paris, France

Tel: 00 33 1 44 73 52 42

Fax: 00 33 1 44 73 52 19

Short title: Search for mutations in the *LHX2* gene

Keywords: Pituitary deficiency, ectopic posterior pituitary, ocular abnormalities, *LHX2*.

Abstract

In humans, pituitary hormone deficiency may be part of a syndrome including extra-pituitary defects like ocular abnormalities. Very few genes have been linked to this particular phenotype. In the mouse, *Lhx2*, which encodes a member of the LIM class of homeodomain proteins, was shown to be expressed during early development in the posterior pituitary, eye and liver, and its expression persists in adulthood in the central nervous system. *Lhx2*^{-/-} mice display absence of posterior pituitary and intermediate lobes, malformation of the anterior lobe, anophthalmia and they die from anemia.

We tested the implication of the *LHX2* gene in patients presenting pituitary hormone deficiency associated with ectopic or non visible posterior pituitary and ocular defects. A cohort of 76 patients, including two familial cases, was studied. Direct sequencing of the *LHX2* coding sequence and intron/exon boundaries was performed. *LHX2* transcriptional activity on pituitary promoters was tested *in vitro*.

Seven heterozygous sequence variations were identified, among which two are novel missense (p.Ala203Thr and p.Val333Met). *In vitro*, *LHX2* activates transcription of *TSHB*, *PRL* and *POU1F1* promoters in HEK293 cell line. A synergistic action of *POU1F1* and *LHX2* was also shown on these promoters. The two variations were tested and no significant difference was observed leading to the conclusion that there are not deleterious.

These results suggest that, if *LHX2* is involved in pituitary hormone deficiency associated with posterior pituitary and ocular defects, it would be a rare cause of this disease condition.

Introduction

Three lobes of dual embryonic origin compose the pituitary gland. The anterior and intermediate lobes derive from an invagination of the oral ectoderm (Rathke's pouch) whereas, the posterior lobe is an evagination of the neuroectoderm from the infundibulum. Rathke's pouch and infundibulum have a close contact during embryonic development depending on the sequential temporal and spatial expression of signalling molecules and transcription factors (Zhu et al. 2007). Among them, three members of the LIM (Lin-11, Isl-1, and Mec-3)-homeodomain proteins family, *Lhx2*, *Lhx3* and *Lhx4* participate to pituitary development (Sheng et al. 1997; Zhao et al. 2010). These transcription factors are made of an homeodomain and two zinc-finger LIM domain which are involved in protein-protein interactions and may modulate the function of the homeodomain (Dawid et al. 1998). In patients with syndromic forms of combined pituitary hormone deficiency (CPHD), mutations have been identified in *LHX3* and *LHX4* genes but not in the *LHX2* gene. Other genes (*HESX1*, *SOX2* and *SOX3*) have also been implicated in syndromic CPHD (for review, (Kelberman et al. 2009)).

Lhx2 mRNA has been detected in the developing ventral diencephalon in mice (from e9.5) including the infundibulum and the posterior lobe of the pituitary gland (Zhao et al. 2010) and its expression in the central nervous system persists in adulthood (Xu et al. 1993). The retina also evaginates from the neuroectoderm, and, prior to birth, *Lhx2* is expressed throughout the neural retina, while postnatally, expression becomes restricted to the inner nuclear layer of the retina (Porter et al. 1997; Yun et al. 2009). Furthermore, recent studies on mouse models have demonstrated that, during eye development, *Lhx2* transactivated *Six6* in synergy with *Pax6* (Tetreault et al. 2009). *Lhx2* was also shown to be important for proper cellular organization and differentiation of the liver (Wandzioch et al. 2004) in definitive erythropoiesis (Porter et al. 1997), and it is also an important regulator of hair formation

(Tornqvist et al. 2010) and for complete development of olfactory sensory neurons (Hirota et al. 2004). In mice, functional inactivation of *Lhx2* results in a cerebral cortex of reduced size, anophthalmia, as well as absence of posterior pituitary gland and intermediary lobe, and defects in anterior pituitary lobe organization suggesting a mechanism whereby development of the posterior lobe may affect the development of the anterior and intermediate lobes of the pituitary gland. *Lhx2*^{-/-} mice also develop liver fibrosis; erythropoiesis is incomplete resulting in death by severe anemia prior to birth (Porter et al. 1997; Wandzioch et al. 2004; Zhao et al. 2010). These data are at the origin of two studies involving cohorts of patients with ocular abnormalities associated or not to schizencephaly, but these investigations did not permit to implicate *LHX2* in human pathology (Desmaison et al. 2010; Mellado et al. 2010). However, no study has assessed the implication of *LHX2* in pituitary defects.

Herein, the *LHX2* gene was analysed in 76 patients presenting pituitary deficiency associated with ectopic or non visible posterior pituitary and ocular abnormalities. Two missense variations were identified and functional tests were performed to assess their potential consequences on the transcription of target genes.

Patients and methods

Patients

We studied a cohort of 76 patients, including two familial cases, presenting pituitary deficiency, ectopic or non visible posterior pituitary gland associated with ocular abnormalities. These last include anophthalmia, microphthalmia, optic nerve hypoplasia (ONH), septo-optic dysplasia (SOD), coloboma or other minor signs (strabismus, nystagmus, myopia, hyperopia).

Patients provided their written informed consent to perform genetic studies according to the French law.

Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from blood patients using standard techniques (FlexiGene DNA Kit, Qiagen, Hilden, Germany). The five coding exons of the *LHX2* gene were amplified by PCR using primers (available on request) designed from the *LHX2* genomic sequence. A robot (MicroLab Star Let, Hamilton) was used to prepare the PCR mix reaction. After amplification, fragments were purified using Exo-SAPit (GEHealthcare, Cleveland, OH) and both forward and reverse strands were sequenced using Big Dye DNA sequencing kit (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) with primers available on request. Reactions were run on the 3730XL sequencer (Applied Biosystems) and analysed with SeqScape v2.6 software (Applied Biosystems). Sequence variations were numbered with the adenine of the ATG initiation codon as the first nucleotide (NC_000009.11).

Plasmid constructs

The wild-type *LHX2* cDNA was amplified from human pituitary cDNA (Human Pituitary Gland QUICK-Clone cDNA, Clontech, Mountain View, CA) using primers *LHX2*cDNA-F 5'-CCGCCGCGATGCTGTTCCACAGTC-3' and *LHX2*cDNA-R 5'-GAGTCATTAGAAAAGGTTGGTAAGAGTC-3'. The human *LHX2*-wt cDNA was subcloned into the expression vector pcDNA3 (pcDNA3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) then named p.*LHX2*-wt. The Val333Met and Ala203Thr variants were introduced in p.*LHX2*-wt using the Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA); the resulting constructs, which were confirmed by sequencing, were designated p.*LHX2*-V333M and p.*LHX2*-A203T, respectively.

The human *POU1F1* cDNA (p.*POU1F1*-wt) (Tenenbaum-Rakover et al. 2011) was previously cloned into the pTracer expression vector (Invitrogen). The human *Thyrotropin beta-subunit* (*TSHB*) promoter (Sobrier et al. 2004), the human *Prolactin* (*PRL*) promoter (Tenenbaum-Rakover et al. 2011), the human *POU1F1* promoter (Machinis et al. 2005), and a 547-bp fragment (nt -548 to nt -1) of the human *alpha-GSU* (*AGSU*) promoter were cloned into the pGL3 basic luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI) according to standard procedures.

Cell culture and transfections

HEK293, GH4C1 and GH3 cells were grown in DMEM medium (Invitrogen) containing 10% (v/v) fetal calf serum at 37°C. All transfections were performed at 60% confluence in 12-well culture plates by the Lipofectamine-Plus method (Invitrogen) in OptiMEM according to the manufacturer's standard protocol. Cells were co-transfected with 50 ng of reporter constructs and 25 or 50 ng of the empty pcDNA3 vector and/or p.*LHX2*-wt, p.*LHX2*-V333M, p.*LHX2*-A203T in the presence or absence of the p.*POU1F1*-wt construct.

Luciferase activity assays

Forty eight hours after transfection, cell extracts were prepared and assayed for luciferase activity using the Promega assay system. Luciferase activity was normalized to protein concentration, which was measured using the Coomassie Plus protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL). Each transfection experiment (in triplicate) was performed independently at least three times.

Results

Cohort selection

Based on *Lhx2* expression studies performed in the mouse and to the phenotypic features of *Lhx2*^{-/-} mice, the *LHX2* gene was screened for mutations in a cohort of patients with pituitary hormone deficiency associated with ectopic or non visible posterior pituitary gland and ocular abnormalities (see Patients and methods). Twenty-five patients displayed isolated growth hormone deficiency (IGHD) and 51 had CPHD. Prior to *LHX2* gene sequencing, these patients were analysed for one or several genes (depending of the pituitary phenotype, the MRI aspect, the sex and the associated abnormalities) known to be involved in pituitary hormone deficiency associated with ocular and/or posterior pituitary abnormalities: *HESX1* in 95% of the patients, *OTX2* in 29%, *SOX2* in 38% and *SOX3* in 44%.

Identification of new *LHX2* sequence variations

Seven heterozygous variations were identified (Table 1). The c.726-21G>T, and c.1017G>C (p.Ala339Ala) variations were previously described in patients with schizencephaly (five and one patients, respectively) (Mellado et al. 2010). The c.776C>A (p.Pro259Gln) variation has already been identified in a patient with ocular abnormalities (coloboma and microphthalmia) (Desmaison et al. 2010). Proline 259 is not conserved among species, and a glutamine is present at this position in zebrafish and chicken. After *in silico* analysis the authors considered this variation as non damaging (Desmaison et al. 2010); thus, the c.776C>A variation is probably non deleterious. DNAs of two patients from the same family were analysed in the current study: the girl presents two heterozygous polymorphisms, c.783>G/C (p.Pro261Pro) and c.934-51G>A, whereas her brother is homozygous at these positions. This result allowed us to exclude *LHX2* as the causative gene in this family. Four new base changes have been identified in this study: two of them, c.1-88G>A and c.1-140G>A, are located in the 5' transcribed untranslated region (Figure 1A), and the two others are missense variations.

The first heterozygous missense variant consists in a G-to-A transition at position 607 (c.607G>A) in exon 3, changing alanine 203 to threonine (p.Ala203Thr) (Figures 1A and 1B) which is located between the LIM2 domain and the homeodomain. This variation was identified in an adopted patient presenting IGHD, non visible posterior pituitary gland, septo-optic dysplasia and glaucoma. This amino acid is not conserved (Figure 1B, bottom).

The second heterozygous variant, c.997G>A (p.Val333Met) (exon 5), was identified in a patient with IGHD, a hypoplastic anterior pituitary, ectopic posterior pituitary and septo optic dysplasia (Figures 1A and 1C). Valine 333 does not belong to a known functional domain but is well conserved among species and methionine is never found at this position (Figure 1C, bottom).

In both cases, parental DNAs were not available for study. However, as these two variations involve a CpG dimer, it is not excluded that they occurred *de novo*.

LHX2 activates the *TSH B*-subunit, *PRL*, and *POU1F1* promoters in HEK293 cell line

Previous studies have shown that Lhx2 activates the rat *TshB* promoter in GH3 and α TSH cells (Kim et al. 2007) and the mouse *Gsu* promoter in HEK293 cell lines (Showalter et al. 2004). The consensus target sequences (G/T CAAT T/A, (Kim et al. 2007) or TAAT T/A G, (Roberson et al. 1994; Hirota et al. 2004)), were also found in the *PRL* and *POU1F1* promoters (data not shown). We therefore tested the ability of LHX2 to activate these promoters (i.e. *TSHB*, *PRL*, *AGSU* and *POU1F1*) with the aim to assess the functional consequences of the Ala203Thr and Val333Met variations.

To identify the cell line in which these experiments should be done, GH3, GH4C1 (rat pituitary cell lines) and HEK293 (human embryonic kidney) cells were transfected with the expression plasmid p.LHX2-wt and with *TSHB*, *PRL*, *POU1F1* or *AGSU* promoter constructs. As shown in Figure 2, compared to the empty vector, LHX2 activates the *TSHB* promoter in

these three cell lines (Figure 2A-C). However, the activation of the other promoters was observed only in HEK293 (Figure 2C) and *AGSU* promoter activation was never detected. The HEK293 cell line will therefore be used in the following tests.

LHX2 variations are probably not implicated in the disease phenotype

Even if alanine 203 and valine 333 of LHX2 are not located in identified functional domains, they may be important for efficient transcriptional activity. Thus, luciferase assays were performed in HEK293 to test the transcriptional activity of LHX2-V333M and LHX2-A203T. As shown on Figure 3A, LHX2-wt is able to activate by 7 fold the human *TSHB* promoter, as compared to cells transfected with an empty vector. The transcriptional activity of the LHX2-V333M and LHX2-A203T proteins tested on the same promoter was found to be similar to the wild-type protein (about 8 and 6 fold, respectively). This experiment was also performed on the *PRL* and the *POU1F1* promoters: although LHX2-wt activates these promoters (3 and 7 fold respectively), no significant difference was observed with the two LHX2 variants (Figures 3B-C).

In order to test a synergistic action of POU1F1 and LHX2 (as it is the case for POU1F1 and LHX3 (Bach et al. 1995)), HEK293 cells were co-transfected with the p.*POU1F1*-wt and the p.*LHX2* constructs (wild-type, V333M or A203T). Coexpression of the POU1F1-wt and LHX2-wt proteins resulted in an increased transcriptional activity on all promoters tested, compared to activation in the presence of p.*LHX2*-wt or p.*POU1F1*-wt alone, demonstrating a synergistic effect of POU1F1 and LHX2 (Figures 3A-C). The same results were obtained with p.*LHX2*-V333M and p.*LHX2*-A203T. These observations suggest that the two identified *LHX2* missense variations are not deleterious.

Discussion

Lhx2 plays a critical role in the development of several organs including the pituitary gland and eye. DNA samples from a selected cohort of patients presenting pituitary deficiency with posterior pituitary and ocular abnormalities were sequenced in the *LHX2* gene. Among the seven heterozygous variations detected, four are novel, two of them leading to amino acid change, the p.Ala203Thr and the p.Val333Met missense variations. This prompted us to test the capacity of LHX2 to activate transcription from several candidate promoter targets.

Binding sequences for LHX2 determined by Kim (Kim et al. 2007), Hirota (Hirota et al. 2004) and Roberson (Roberson et al. 1994) are present in the *AGSU*, *TSHB*, *PRL* and *POU1F1* promoters. Showalter et al. (Showalter et al. 2004) showed activation of the mouse *AGsu* promoter by mouse Lhx2 but not by axolotl Lhx2; in the current study, the human LHX2 does not activate this promoter. These data may reflect species-specific effects. Activation of the rat *TshB* promoter by Lhx2 has been demonstrated in thyrotrope cell lines (Kim et al. 2007), and, here, in all cell lines tested. In transfected HEK293 cells, LHX2 is able to activate the human *TSHB*, *PRL* and *POU1F1* promoters. No significant differences were detected with the mutant proteins (LHX2-A203T and LHX2-V333M) compared to the wild-type LHX2 protein.

To determine if POU1F1 could be a coactivator of LHX2, as it was shown for LHX3 (Bach et al. 1995), similar experiments were performed in cells coexpressing LHX2 and POU1F1. While no synergy was detected between Lhx2 and Pou1f1 on the rat *TSHB* promoter (Kim et al. 2007), a synergy was observed in this study, not only on the human *TSHB* promoter, but also for all tested promoters. There was no difference between the LHX2 variants and the wild-type protein suggesting again that LHX2-V333M and LHX2-A203T could be uncommon polymorphisms.

The current study represents the third screening of *LHX2* for mutations (Desmaison et al. 2010; Mellado et al. 2010). The data so far obtained do not allow to implicate this gene in

human pathology. If they exist, *LHX2* mutations are therefore a rare cause of pituitary deficiency and/or ocular abnormalities.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-GENO-026-02).

C.P is a recipient of a fellowship from the Université Pierre et Marie Curie (Paris, France).

Acknowledgments

We are grateful to the family for agreeing to participate in the study. We thank Camille Barbier for technical assistance.

References

- Bach I, Rhodes S J, Pearse R V, 2nd, Heinzl T, Gloss B, Scully K M, Sawchenko P E and Rosenfeld M G 1995 P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7) 2720-2724.
- Dawid I B, Breen J J and Toyama R 1998 LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* **14**(4) 156-162.
- Desmaison A, Vigouroux A, Rieubland C, Peres C, Calvas P and Chassaing N 2010 Mutations in the LHX2 gene are not a frequent cause of micro/anophthalmia. *Mol Vis* **16** 2847-2849.

- Hirota J and Mombaerts P 2004 The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23) 8751-8755.
- Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson I C and Dattani M T 2009 Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* **30**(7) 790-829.
- Kim K K, Song S B, Kang K I, Rhee M and Kim K E 2007 Activation of the thyroid-stimulating hormone beta-subunit gene by LIM homeodomain transcription factor Lhx2. *Endocrinology* **148**(7) 3468-3476.
- Machinis K and Amselem S 2005 Functional relationship between LHX4 and POU1F1 in light of the LHX4 mutation identified in patients with pituitary defects. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(9) 5456-5462.
- Mellado C, Poduri A, Gleason D, Elhosary P C, Barry B J, Partlow J N, Chang B S, Shaw G M, Barkovich A J and Walsh C A 2010 Candidate gene sequencing of LHX2, HESX1, and SOX2 in a large schizencephaly cohort. *Am J Med Genet A* **152A**(11) 2736-2742.
- Porter F D, Drago J, Xu Y, Cheema S S, Wassif C, Huang S P, Lee E, Grinberg A, Massalas J S, Bodine D, Alt F and Westphal H 1997 Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**(15) 2935-2944.
- Roberson M S, Schoderbek W E, Tremml G and Maurer R A 1994 Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Biol* **14**(5) 2985-2993.
- Sheng H Z, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter S S, Mahon K A and Westphal H 1997 Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* **278**(5344) 1809-1812.
- Showalter A D, Yaden B C, Chernoff E A and Rhodes S J 2004 Cloning and analysis of axolotl ISL2 and LHX2 LIM-homeodomain transcription factors. *Genesis* **38**(3) 110-121.

- Sobrier M L, Attie-Bitach T, Netchine I, Encha-Razavi F, Vekemans M and Amselem S 2004 Pathophysiology of syndromic combined pituitary hormone deficiency due to a LHX3 defect in light of LHX3 and LHX4 expression during early human development. *Gene Expr Patterns* **5**(2) 279-284.
- Tenenbaum-Rakover Y, Sobrier M L and Amselem S 2011 A novel POU1F1 mutation (p.Thr168IlefsX7) associated with an early and severe form of combined pituitary hormone deficiency: functional analysis and follow-up from infancy to adulthood. *Clin Endocrinol (Oxf)* **75**(2) 214-219.
- Tetreault N, Champagne M P and Bernier G 2009 The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Dev Biol* **327**(2) 541-550.
- Tornqvist G, Sandberg A, Hagglund A C and Carlsson L 2010 Cyclic expression of *lhx2* regulates hair formation. *PLoS Genet* **6**(4) e1000904.
- Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman S L and Carlsson L 2004 *Lhx2*^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47) 16549-16554.
- Xu Y, Baldassare M, Fisher P, Rathbun G, Oltz E M, Yancopoulos G D, Jessell T M and Alt F W 1993 LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1) 227-231.
- Yun S, Saijoh Y, Hirokawa K E, Kopinke D, Murtaugh L C, Monuki E S and Levine E M 2009 *Lhx2* links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* **136**(23) 3895-3906.
- Zhao Y, Mailloux C M, Hermes E, Palkovits M and Westphal H 2010 A role of the LIM-homeobox gene *Lhx2* in the regulation of pituitary development. *Dev Biol* **337**(2) 313-323.
- Zhu X, Gleiberman A S and Rosenfeld M G 2007 Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* **87**(3) 933-963.

Legend to figures

Figure 1: Human *LHX2* genomic organization and new heterozygous variations identified in the cohort.

A, Schematic representation of human *LHX2* genomic organization. The five coding exons (1 to 5) are represented by rectangles. The LIM domains (LIM1 and LIM2) and homeodomain (HD) are shown in light gray and dark gray respectively. The locations of the translation initiation codon (ATG) and stop codon are indicated. The exons are drawn to scale except exons 1 and 5. New identified changes are indicated by arrows. B-C, Electrophoregrams for a control and the patient (top) and conservation of amino acids 203 and 333 of the *LHX2* protein (bottom) are shown. The *LHX2* amino acid sequence was aligned using BOXSHADE 3.21 software with those of several species.

Figure 2: *LHX2* transcription activation on the *AGSU*, *TSHB*, *POU1F1* and *PRL* promoters in three cell lines.

GH3 (A), GH4C1 (B) and HEK293 (C) cells are co-transfected with 50 ng of promoters fused to luciferase reporter gene and 50 ng of p.*LHX2*-wt. Each transfection was performed in triplicate and results are expressed as fold-induction relative to control empty vector.

Figure 3: Consequences of the *LHX2* variations on transcriptional activity and *LHX2*/*POU1F1* co-activation on the *TSHB*, *POU1F1* and *PRL* promoters. HEK293 cells were transfected with 50 ng of *TSHB* (A), *POU1F1* (B) and *PRL* (C) promoters constructs in the presence of pcDNA3 empty vector, or p.*LHX2*-wt, p.*LHX2*-V333M, p.*LHX2*-A203T and p.*POU1F1*-wt. A representative experiment (performed in triplicate) from three independent experiments is presented here.

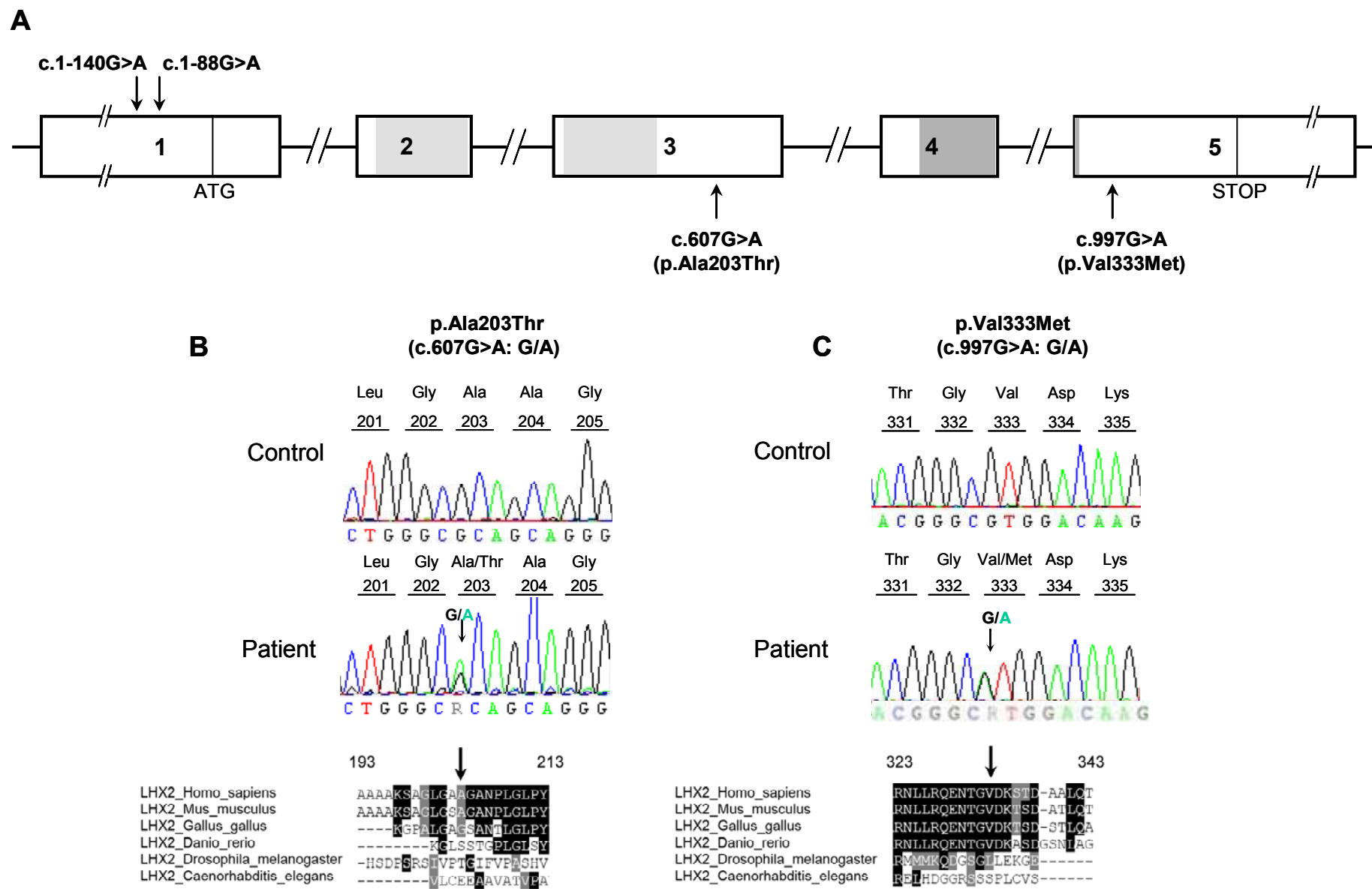


Figure 1

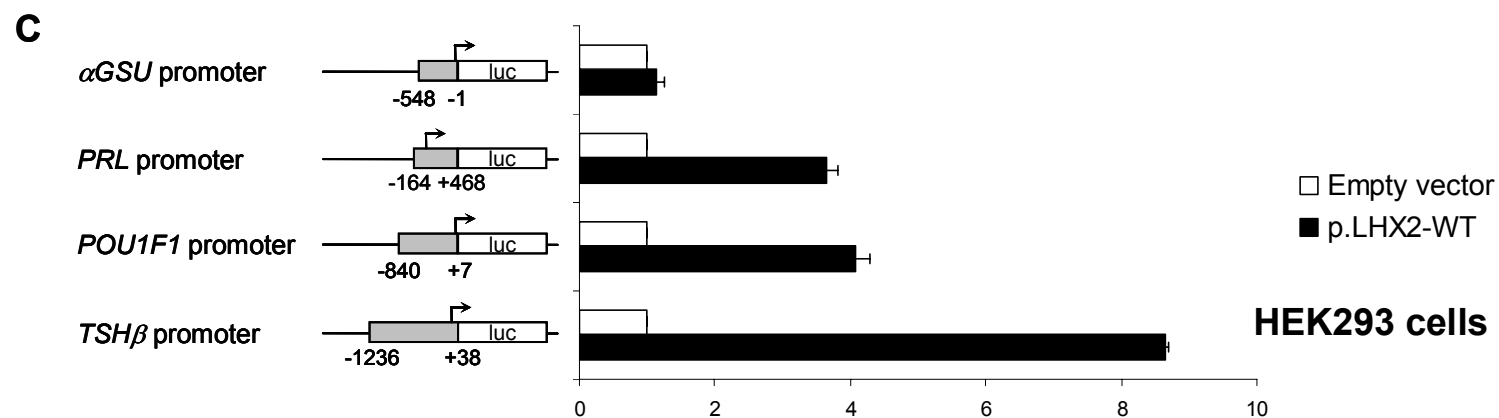
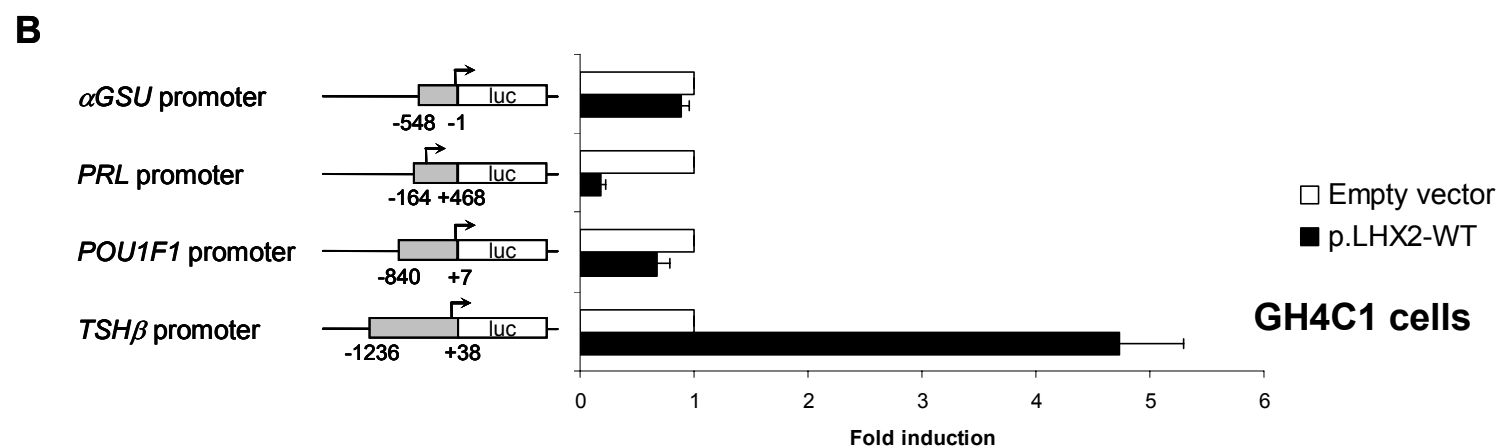
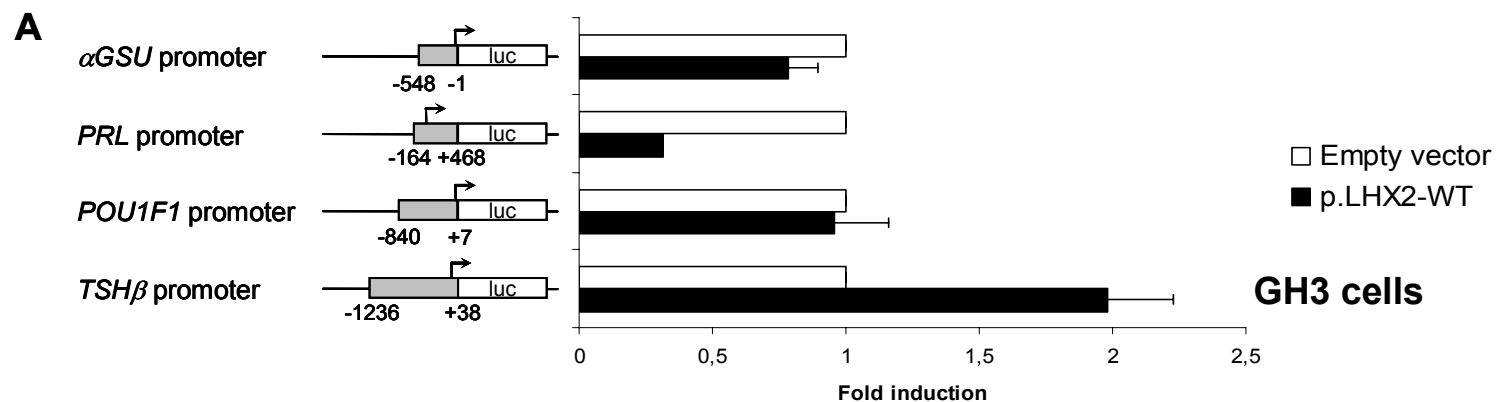


Figure 2

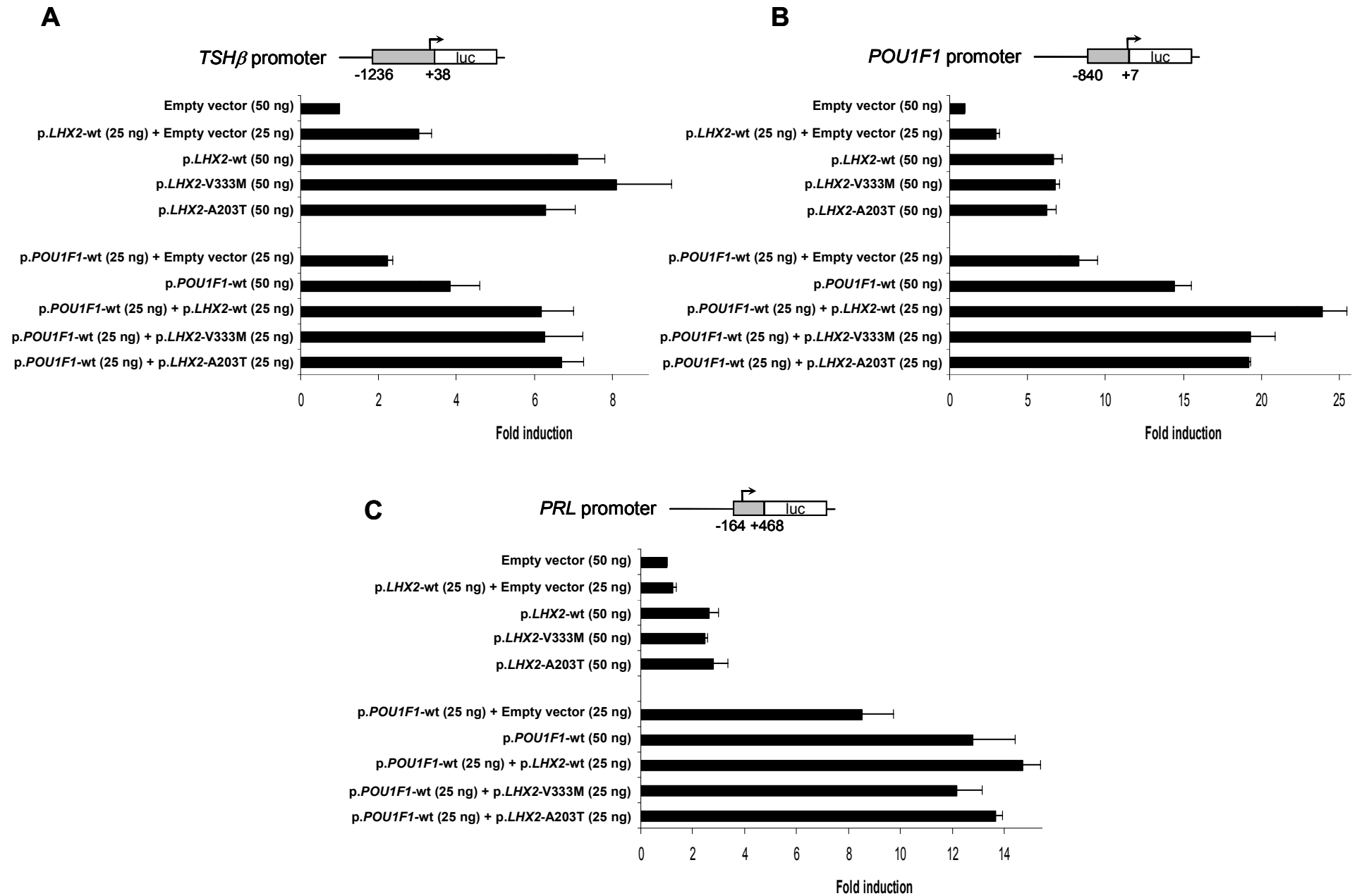


Figure 3

Table 1: Patients phenotypes in whom sequence changes were identified in the *LHX2* gene.

Patients	Phenotype			Nucleotidic variation	Amino acid change	SNP Id
	Pituitary hormone deficiency	Pituitary morphology	Ocular and central nervous system abnormalities			
Cro6790	IGHD	HAP Non visible PP	Congenital cataract	c.1-140G>A: G/A		n/a
Cro5414	IGHD	HAP EPP	Optic nerve inflammation Arnold Chiari	c.1-88G>A: G/A		n/a
Cro5236	IGHD	HAP Non visible PP	SOD, glaucoma, strabismus	c.607G>A: G/A	p.Ala203Thr	n/a
Cro5731	CPHD (GH,PRL, TSH, cortisol)	AAP EPP	SOD	c.726-21G>T: G/T		Five patients with schizencephaly (Mellado et al. 2010)
Cro6568	CPHD (GH, ACTH, FSH, LH)	HAP EPP	Undefined ocular abnormalities	c.776C>A: C/A	p.Pro259Gln	rs140229756 One patient with microphthalmia and coloboma (Desmaison et al. 2010)
Cro6948	IGHD	HAP EPP	SOD	c.997G>A: G/A	p.Val333Met	n/a
Cro5386	IGHD	HAP EPP	SOD, coloboma, microphthalmia	c.1017G>C: G/C	p.Ala339Ala	rs138022431 One patient with schizencephaly (Mellado et al. 2010)

HAP: Hypoplastic Anterior Pituitary, AAP: Aplastic Anterior Pituitary, EPP: Ectopic Posterior Pituitary, PP: Posterior Pituitary, SOD: Septo-Optic Dysplasia, n/a: non applicable.

Discussion

Malgré l'absence d'expression de *Lhx2* dans l'antéhypophyse, des anomalies d'organisation ont cependant été observées chez les souris *Lhx2*^{-/-} [Porter et al., 1997; Zhao et al., 2010] démontrant l'implication de *Lhx2* dans le développement du lobe antérieur de la glande pituitaire. Cela a déjà été observé avec *Sox3* qui n'est pas exprimé dans les cellules antéhypophysaires mais qui a été impliqué en pathologie humaine dans des déficits antéhypophysaires [Rizzoti et al., 2004].

Lors de cette étude, plusieurs polymorphismes ont été retrouvés dont certains ont fait l'objet d'une publication [Desmaison et al., 2010; Mellado et al., 2010]. Trois nouvelles variations introniques n'altérant pas de sites d'épissage ainsi que deux variations faux-sens ont été identifiées. Même si les variations *LHX2* c.997G>A (p.Val333Met) et c.607G>A (p.Ala203Thr) ne sont pas situées dans l'homéodomaine ou le domaine SD et que l'alanine 203 est peu conservée par rapport à la valine 333, ces variations ont été étudiées.

LHX2 permettant l'activation des promoteurs *αGSU* et *TSHβ* [Kim et al., 2007; Roberson et al., 1994] et la séquence consensus déterminée par Kim et al. étant retrouvée dans la séquence des promoteurs *PRL* et *POU1F1*, ces quatre promoteurs ont été testés.

Les tests effectués sur différentes lignées cellulaires ont montré des résultats très hétérogènes. Bien qu'une activation du promoteur *TSHβ* en présence de *LHX2* ait été observée sur les trois lignées cellulaires (GH3, GH4C1 et HEK293), de grandes différences sont apparues avec les autres promoteurs testés. En effet, les promoteurs *PRL*, *αGSU*, et *POU1F1* n'ont pas montré d'activation en co-transfectant *LHX2* dans les cellules pituitaires GH3 et GH4C1. Les cellules HEK293 ont donc été les cellules utilisées pour la suite des expériences.

En cellules HEK293, une activation des promoteurs *PRL*, *TSHβ* et *POU1F1* a été observée en présence de *LHX2* normal mais aucune différence significative n'a été notée en présence des deux variations *LHX2* c.997G>A (p.Val333Met) et c.607G>A (p.Ala203Thr). Comme *LHX3*, *LHX2* agit en synergie avec *POU1F1* sur les différents promoteurs testés, cependant, les variations n'induisent pas de différence par rapport à la protéine normale. Ces résultats suggèrent que ces

variations constituent des polymorphismes rares non responsables du phénotype des patients.

Cependant, d'autres lignées cellulaires (pituitaires ou oculaires) ou d'autres cibles seraient peut être plus adaptées. L'équipe de Rhodes a notamment observé un effet activateur de Lhx2 de l'axolotl sur une construction de promoteur contenant des sites multiples PGBE (*Pituitary Glycoprotein Basal Element*) [Showalter et al., 2004].

Les mutations de *LHX2*, si elles existent, constituent probablement une cause très rare de déficits hypophysaires associés à une post-hypophyse ectopique et des anomalies oculaires.

1.3 Recherche de mutations du gène *LHX3*

Chez la souris, il a été montré que *Lhx3* est impliqué dans le développement de la glande pituitaire [Sheng et al., 1996], des motoneurones [Sharma et al., 1998] et de l'oreille interne [Hume et al., 2007]. Après invalidation génique de *Lhx3*, la poche de Rathke se forme initialement mais ne poursuit pas son développement. *LHX3* est un membre de la famille des facteurs de transcription à domaines LIM. En pathologie humaine, *LHX3* est impliqué dans des CPHD associés à une rigidité cervicale et une surdité. A ce jour, seulement onze mutations de transmission récessive ont été identifiées chez des patients issus d'une union consanguine [Bhangoo et al., 2006; Bonfig et al., 2011; Kristrom et al., 2009; Netchine et al., 2000; Pfaeffle et al., 2007; Rajab et al., 2008]. Ces défauts incluent des délétions (de 23 paires de base au gène entier), des mutations faux-sens, des altérations des sites d'épissage, ou des décalages du cadre de lecture menant à un codon stop précoce.

Deux nouvelles mutations hétérozygotes ont été retrouvées chez un patient présentant un CPHD, une anomalie auditive, et une scoliose. L'une de ces mutations héritée du père, altère un site d'épissage (c.252-3C>G) menant à une protéine tronquée ne contenant que le domaine LIM1 et la seconde, héritée de la mère, c.353G>A (p.Cys118Tyr), conduit à une perte partielle de l'activité transcriptionnelle et de la synergie avec POU1F1. La mutation c.252-3C>G est retrouvée chez le père et la grand-mère paternelle qui présentent un phénotype modéré (rotation du cou limitée).

L'effet des mutations et l'hypothèse d'un effet dominant négatif d'une des protéines mutées ont été testés *in vitro*. Cette étude a permis également de mettre en place le premier diagnostic prénatal pour cette atteinte phénotypique grave.

Article 2 : Symptomatic heterozygotes and prenatal diagnoses in a non-consanguineous family with syndromic combined pituitary hormone deficiency resulting from two novel LHX3 mutations

Legend to supplemental figures

Fig. S1: Cerebral magnetic resonance imaging and computed tomography scan of the cervical spine

(A) Cerebral MRI: sagittal section for patient III2 showing a thin corpus callosum (cc); a posterior pituitary in place (pp).

(B) CT scan of the cervical spine in the father (II1) of the index case (left panel) and the index case (III2, right panel). Upper images (sagittal plane) reveal a convex-concave atlantoaxial joint in the index case (white arrow). Middle images (coronal plane) reveal an increased inclination of the atlantoaxial joint surface in the index case (white arrows). Lower images (axial plane) reveal a cleft in the atlas body and anterior arch in the index case (white arrow).

Fig. S2: Evolutionary conservation of cysteine 118 and predicted impact of tyrosine 118 on the 3D structure of the LIM2 domain

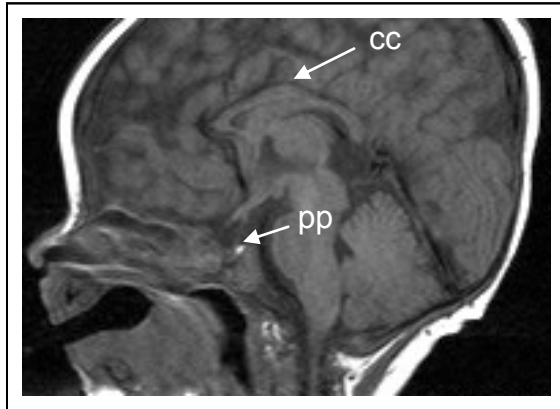
(A) Interspecies similarity (shown in one-letter code) of the LIM2 domain of LHX3 aligned with sequences of the LIM2 domain found in 7 other members of the LHX family. The cysteine residue at position 118 (arrow) is one of the 15 amino acids that are invariant in the 55 aminoacid domain. Cysteine 118 (asterisk) is involved in the second zinc finger structure schematically represented under the alignment.

(B) Visualisation of the 3D structure of the Lhx3-LIM domain by using the RasMol software and crystallographic data from Bahti et al. (crystal 2RGT) (1). The wild-type and Lhx3-C118Y models are superimposed showing, on two different orientations, that tyrosine (red) in place of cysteine (yellow) would modify accessibility of the zinc atom (purple). However, even if the amino acid substitution involves a residue essential for zinc finger formation (like cysteine 118), as shown recently through the study of another zinc finger domain (2), in case of such mutations, the overall structure can be still preserved, but a change in the finger dynamics and stability would occur, with possible consequences for protein recognition. In keeping with this hypothesis is the diminished (and not abolished) transcriptional activity of LHX3-C118Y.

Supplementary references

1. **Bhati M, Lee M, Nancarrow AL, Bach I, Guss JM Matthews JM** 2008 Crystallization of an Lhx3-Isl1 complex. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 64:297-299
2. **Cordier F, Vinolo E, Veron M, Delepierre M Agou F** 2008 Solution structure of NEMO zinc finger and impact of an anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency-related point mutation. *J Mol Biol.* 377:1419-1432

A



B

sagittal



coronal



axial

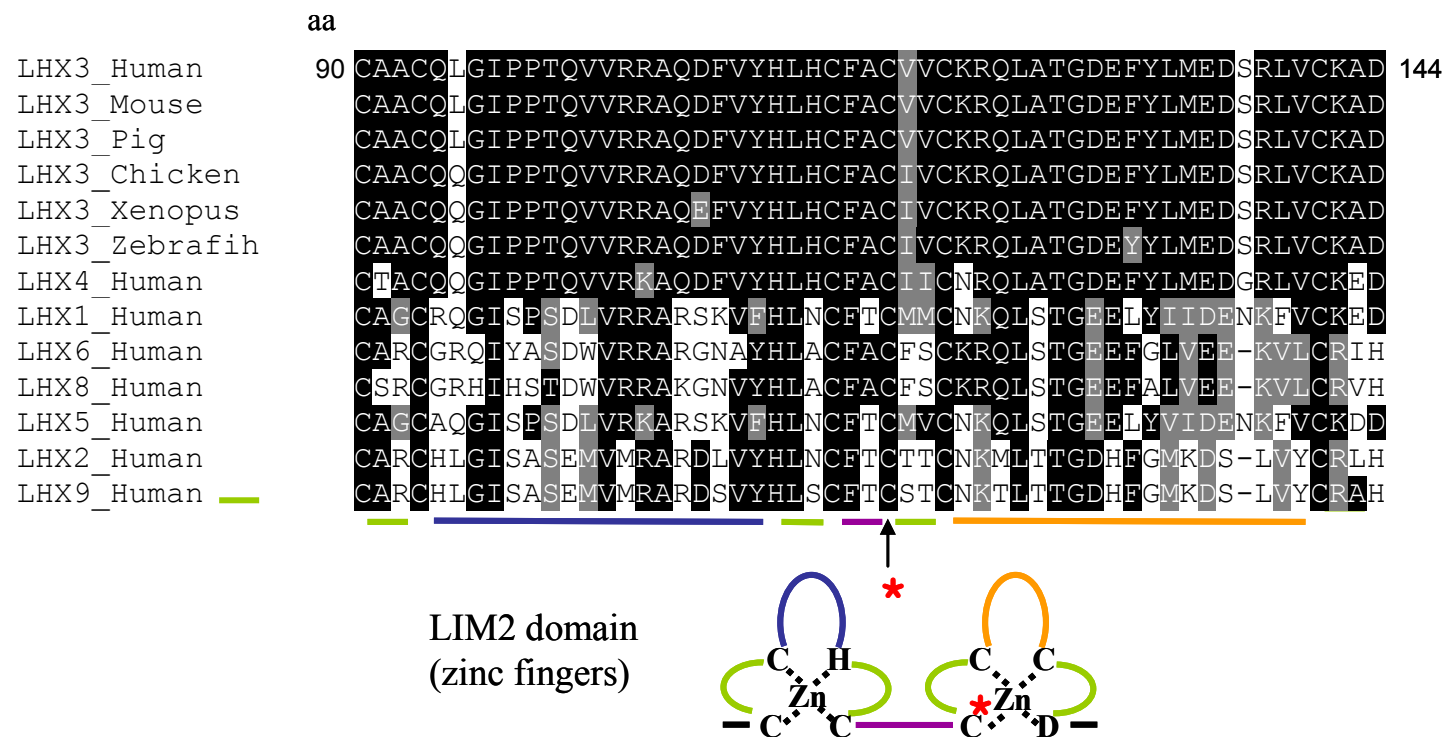


III1

III2

Fig.S1

A



B

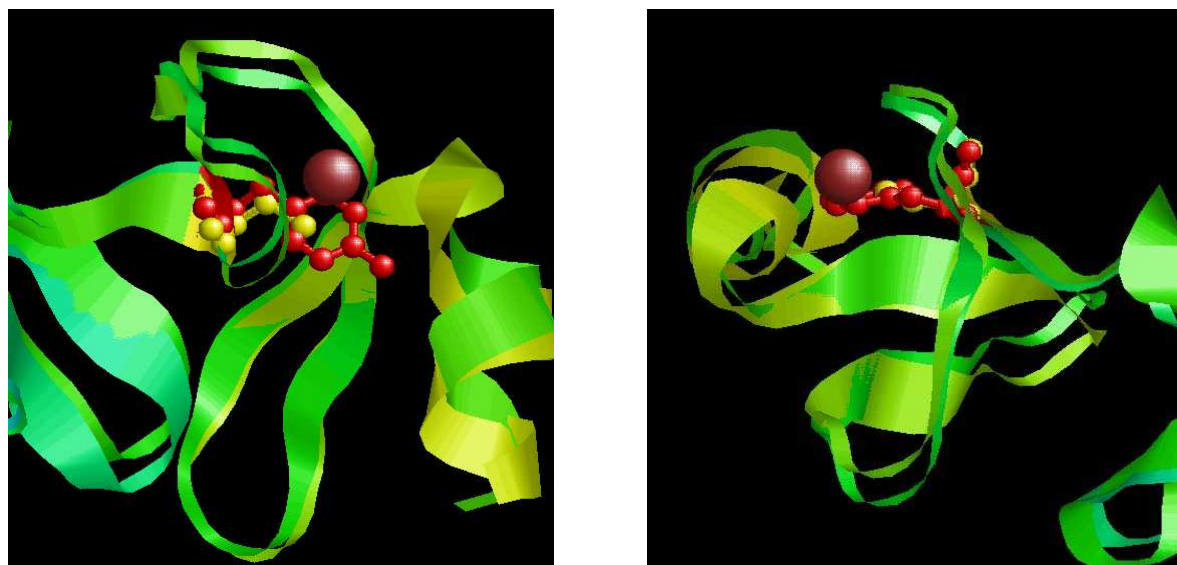


Fig.S2

Discussion

Deux nouvelles mutations hétérozygotes de *LHX3* ont été identifiées chez un patient issu d'une union non consanguine permettant d'assigner complètement à ce gène l'association de certains symptômes décrits uniquement chez des patients consanguins. La première mutation, c.353G>A (p.Cys118Tyr), concerne un acide aminé très conservé chez les autres espèces mais également dans les autres protéines de la même famille et situé dans l'une des deux structures en doigt de zinc, le domaine LIM2.

Les analyses *in silico* à partir des données de cristallographie, montrent que cette mutation entraîne un changement de la structure tridimensionnelle empêchant l'atome de zinc de s'insérer correctement pour former le doigt de zinc. Cependant, bien que l'activité transcriptionnelle soit diminuée, elle n'est pas abolie pour autant. L'interaction synergique LHX3-POU1F1 [Bach et al., 1995] est diminuée en présence de la mutation *LHX3* c.353G>A (p.Cys118Tyr).

La seconde mutation (c.252-3C>G) altère l'épissage du troisième exon qui code pour le domaine LIM2 et conduit à une protéine constituée uniquement du domaine LIM1 dont l'activité transcriptionnelle est abolie [Sobrier et al., 2004]. Le père et la grand-mère du cas index portant cette dernière mutation ont un phénotype modéré (rigidité cervicale) qui peut s'expliquer par un effet dominant négatif de la protéine tronquée sur la protéine normale (*testé in vitro*).

L'effet combiné de la mutation *LHX3* c.353G>A (p.Cys118Tyr) (activité transcriptionnelle réduite) et de la mutation c.252-3C>G (activité transcriptionnelle nulle) ayant de plus un effet dominant négatif, explique probablement le phénotype sévère du patient.

Ce patient est le premier cas rapporté de mutations hétérozygotes composites, cette observation permet de mieux comprendre l'implication de *LHX3* dans le développement pituitaire et extra-pituitaire. Le phénotype sévère du patient a justifié un conseil génétique ayant conduit à deux diagnostics prénataux, l'un conduisant à une interruption thérapeutique de grossesse, le second a conduit à la naissance d'un garçon de phénotype normal porteur de la mutation hétérozygote c.252-3C>G héritée du père.

2. Recherche de partenaires de POU1F1 au locus GH humain

L'identification de la mutation POU1F1 p.Pro76Leu chez des patients d'une même famille présentant un phénotype particulier de déficit isolé en hormone de croissance nous a conduit à rechercher d'autres mutations ou variations au sein du gène *POU1F1* et dans la séquence du LCR *GH* chez des patients de même phénotype. En raison, de l'organisation du locus *GH* humain (présence du LCR), nous nous sommes également intéressés à la régulation de l'expression du gène *GH* humain notamment en recherchant les partenaires spécifiques de POU1F1 au niveau du LCR et du promoteur du gène codant pour l'hormone de croissance (*GH-N*).

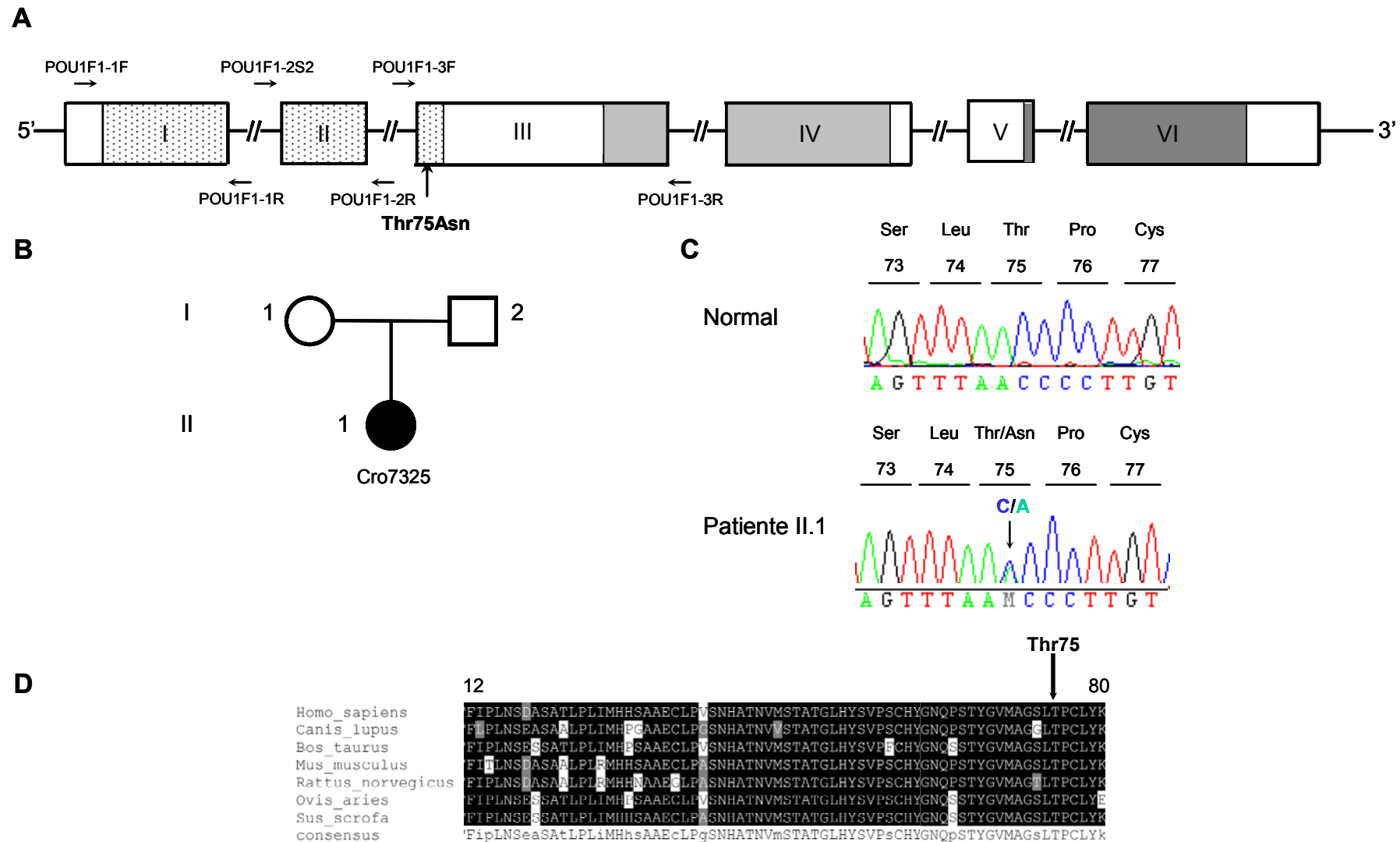


Figure 30 : Variation faux-sens identifiée chez une patiente présentant un déficit isolé en hormone de croissance avec antéhypophyse hypoplasique. A, Schéma du gène *POU1F1* sur lequel est indiquée la position de l'acide aminé 75. B, Arbre généalogique. C, Séquences nucléotidiques des allèles *POU1F1* normal (en haut) et muté (en bas). La thréonine 75 est remplacée par une asparagine. Cette mutation est retrouvée à l'état hétérozygote. D, L'alignement interspèce montre que la thréonine est très conservée au cours de l'évolution. Le TAD (en pointillé), le domaine POU_S (gris clair) et POU_H (gris foncé) sont indiqués.

2.1 Recherche d'anomalies moléculaires de *POU1F1* et du LCR *GH* chez des patients présentant un IGHD

Aucune variation n'a pu être retrouvée au niveau du LCR chez les 300 patients étudiés. En revanche, l'analyse des séquences du TAD de *POU1F1* réalisée chez 250 patients a permis l'identification d'une nouvelle mutation hétérozygote c.302C>A qui entraîne le remplacement de la thréonine 75 en asparagine (*POU1F1* p.Thr75Asn) (**Figure 30A-C**). La patiente présente un IGHD et l'imagerie par résonance magnétique a montré une antéhypophyse hypoplasique. La thréonine 75 est un acide aminé très conservé au cours de l'évolution (**Figure 30D**).

Cette mutation concerne l'acide aminé qui précède celui déjà impliqué (p.Pro76Leu) et semble conforter l'hypothèse du rôle important du TAD dans le mécanisme de régulation du gène *GH* humain, avec également un effet dominant. Cette nouvelle mutation identifiée dans le TAD de *POU1F1* (chez une patiente présentant un IGHD) sera utilisée par la suite pour l'étude de la régulation du gène *GH* humain

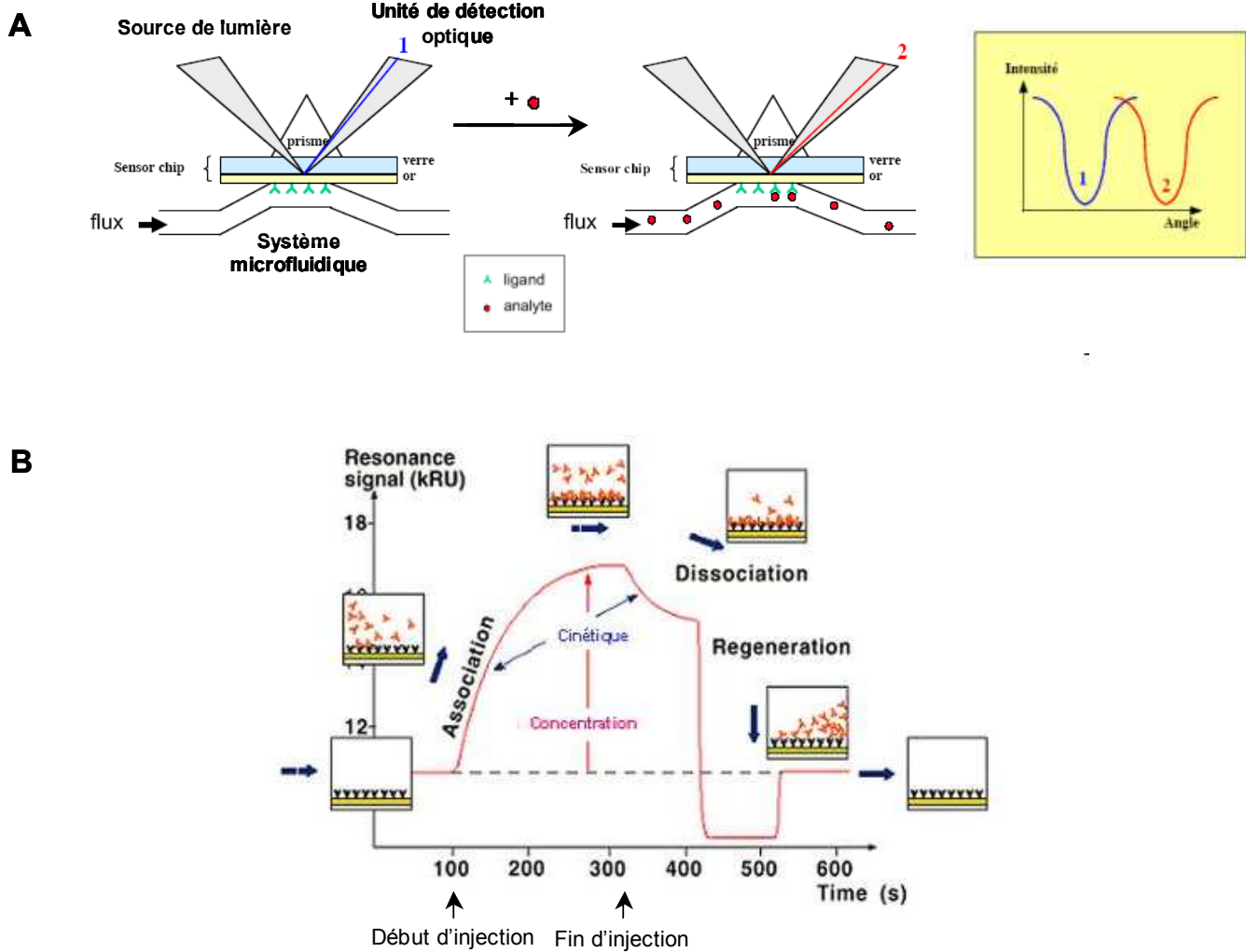


Figure 31 : Principe de la technologie de résonance plasmonique de surface (BIAcore). A, Une onde lumineuse est envoyée sur la puce sur laquelle est fixé le ligand. Cette onde est déviée vers l'unité de détection optique. Lorsque l'analyte est injecté sur la puce, il se fixe sur son ligand, l'onde lumineuse émise est déviée avec un angle différent. B, La mesure de cette variation d'angle obtenue en A est représentée et analysable sous la forme d'un sensorgramme. Il est possible de « régénérer » la puce et d'injecter à nouveau l'analyte.

(Plateforme Interaction biomoléculaire en temps réel, IFR83)

2.2 Recherche de partenaires de POU1F1

2.2.1 Stratégie

Dans le but d'identifier les protéines partenaires de POU1F1 spécifiques du locus *GH* humain, une approche par résonance plasmonique de surface (BIAcore) a été utilisée en couplage avec de la spectrométrie de masse.

La technologie BIAcore permet d'étudier les interactions moléculaires en temps réel. L'appareil fonctionne sur le principe d'un biocapteur qui utilise la résonance plasmonique de surface (SPR) pour détecter des variations de masse à la surface d'une puce et permet l'étude des interactions entre deux molécules (protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides). Le principe du BIAcore 3000 repose sur une méthode optique mesurant l'indice de réfraction à la surface d'une puce. Afin de détecter une interaction, le ligand est immobilisé à la surface d'une puce recouverte d'un film d'or. Les partenaires de liaison, les analytes, sont injectés à débit constant dans une solution aqueuse dans les cellules de la puce. L'analyte se lie à son ligand, l'accumulation de l'analyte à la surface de la puce résulte en l'augmentation de l'indice de réfraction (**Figure 31A**). Ce changement d'indice est mesuré en temps réel et traduit sous forme d'unité de résonance (RU) en fonction du temps, appelé sensorgramme (**Figure 31B**).

Par cette méthode, il est possible de déterminer s'il existe ou non une interaction entre le ligand et l'analyte mais aussi de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation.

De façon plus détaillée, la puce, utilisée pour notre étude, est une puce sur laquelle est fixée de la streptavidine (Puce SA, GE Healthcare). Sur celle-ci, des séquences d'ADN cibles biotinylées vont être immobilisées de manière covalente. Un rayon lumineux est envoyé sur la puce et est dévié vers une unité de détection optique permettant ainsi de connaître la quantité d'ADN fixée sur la puce. Tant que l'analyte n'est pas injecté, le signal enregistré sur le sensorgramme reste constant et permet de définir la ligne de base. Puis l'analyte est injecté sur la puce par un système microfluidique. Lorsque l'analyte se fixe sur son ligand, cela induit un changement de masse à la surface de la puce, la réfringence du milieu en est modifiée et la lumière réfléchie se déplace en suivant un angle de résonance. Sur le sensorgramme, cette liaison analyte-ligand nous est traduite par une augmentation de la réponse en unité de résonance (RU). En fin d'injection, l'analyte se dissocie progressivement, la lumière réfléchie est déviée, se traduisant par une diminution de la réponse en RU. Il est également possible de retrouver le signal de base en utilisant un tampon de régénération adéquat.

Le BIAcore 3000 permet, dans un premier temps, de tester la liaison de la protéine POU1F1 normale mais aussi des protéines mutées sur la séquence du promoteur *GH*, du LCR et des deux séquences cibles. Les constantes d'affinité et de dissociation ont également pu être déterminées par cette approche. De plus, cette technologie permet d'utiliser, en tant qu'analyte, des extraits nucléaires de différentes lignées cellulaires qui contiennent probablement des co-facteurs spécifiques de POU1F1 en interaction sur ses cibles ADN, et de les récupérer par injection d'une bulle d'air. En couplage avec la spectrométrie de masse, les protéines contenues dans l'éluat pourront être identifiées.

2.2.2 Résultats

Production et purification des protéines POU1F1

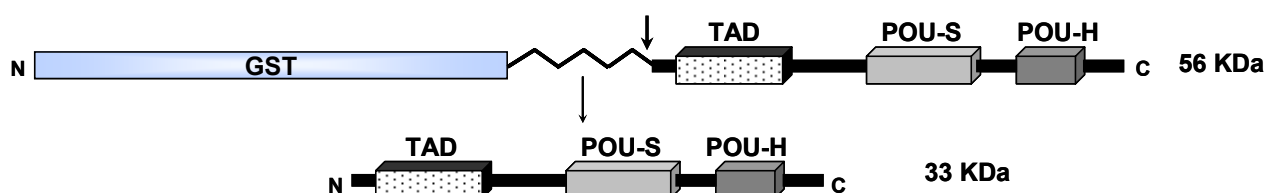
Dans le but d'étudier l'interaction des protéines POU1F1 normale et mutées avec ses cibles ADN du locus *GH* humain (promoteur *GH* et LCR), les protéines ont été produites puis purifiées.

Plusieurs clones ont été testés à partir de petits volumes de culture afin d'identifier celui qui permet une production optimale de protéines. De nombreux tests ont cependant été nécessaires à la mise au point du protocole expérimental. En effet, dans les conditions standards de production de protéines, il est d'usage d'induire les bactéries recombinantes lorsque celles-ci ont une densité optique (DO) supérieure à 0,6, voire lorsqu'elles atteignent leur plateau de croissance. Or, lors des premières préparations à grand volume, il est apparu que la production de POU1F1 normale était extrêmement faible.

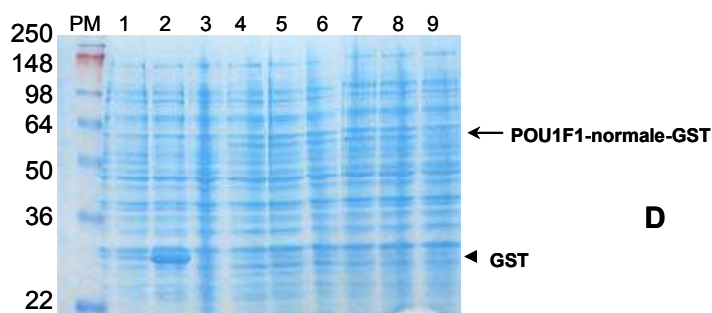
Des tests de production protéique ont alors débuté. La concentration en IPTG nécessaire à l'induction des bactéries n'a pas semblé être un facteur suffisant pour expliquer cette absence de production. En revanche, une gamme DO des bactéries, réalisée avant l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture, a montré qu'il était primordial que la DO des bactéries soit comprise entre 0,1 et 0,2 pour permettre la production de la protéine d'intérêt. Après avoir défini la DO, une gamme temps, après l'ajout de l'IPTG, est réalisée afin de déterminer la durée de culture optimale pour un bon rendement de protéines (**Figure 32**). Le vecteur vide codant pour la GST a servi de témoin d'induction lors des mises au point des cultures des protéines POU1F1.

Une fois cette étape résolue, le protocole de purification a été réalisé et a permis d'obtenir la protéine POU1F1 normale purifiée en quantité suffisante (33 µg de protéines purifiées pour 400 ml de culture) pour commencer les expérimentations sur le BIAcore.

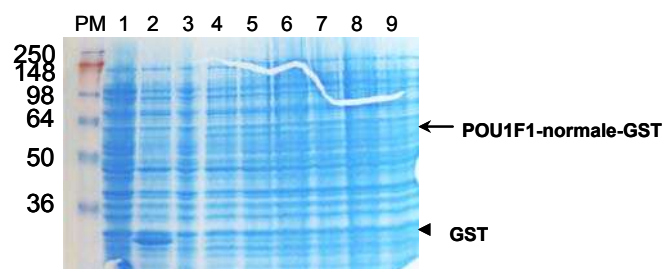
A



B



C



D

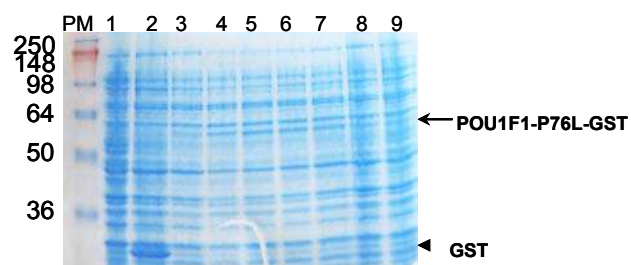


Figure 32 : Optimisation des conditions de production des protéines POU1F1 normale et mutées. A, Schéma de la construction de la protéine POU1F1 étiquetée GST (*Glutathione-S-Transferase*) produite en bactéries *E. Coli* BL21 DE3 Star. La flèche indique la position de clivage par la PreScission Protease. Après purification, le clivage permet l'obtention de la protéine sans GST. B, Détermination de la densité optique (DO) des bactéries nécessaire à une induction optimale. Les lignes 1 et 2 correspondent aux vecteurs vides non induit (1) ou induit (2) avec 0,5 mM d'IPTG (tête de flèche : GST), les lignes 3 à 9 correspondent à la construction POU1F1-normale étiquetée GST produite (flèche) à différentes DO (non induite; 0,12; 0,22; 0,37; 0,49; 0,57; 1 respectivement). Cette gamme a permis de déterminer que la protéine normale était mieux produite à DO comprise entre 0,1 et 0,2 et entre 0,3 et 0,4 pour les protéines mutées (non montrées). C et D, Gamme temps d'induction. En contrôle, le vecteur vide est non induit (ligne 1) ou induit (ligne 2) avec de l'IPTG. Les lignes 3 à 9 correspondent aux bactéries non induites (3) ou induites pendant 1 à 6 heures produisant la protéine normale (C) ou mutée P76L (D).

En revanche, à même condition de production, le rendement obtenu pour la protéine POU1F1-P76L s'est avéré très faible puisque seulement 8 µg de protéines purifiées ont été obtenu à partir d'une culture bactérienne de 4 litres. La migration des aliquots récoltés à chaque étape du protocole expérimental a montré que la quasi totalité de la protéine recombinée mutante était perdue après la lyse cellulaire.

Cette mutation induirait donc un changement de conformation, par rapport à la protéine normale, qui pousserait les bactéries *E. coli* à les isoler sous forme d'agrégats insolubles appelés corps d'inclusion [Williams et al., 1982]. Lorsqu'une protéine n'est pas soluble en bactéries, ce qui est le cas de nombreux facteurs de croissance, il est possible d'isoler les corps d'inclusion, de solubiliser ces protéines en utilisant des agents dénaturants et de permettre ensuite à la protéine de retrouver sa conformation native. Cependant, il est pratiquement impossible de montrer qu'une protéine a bien retrouvé sa conformation native après un traitement dénaturant [Burgess, 2009], et cela est d'autant plus vrai lorsque la structure tridimensionnelle de la protéine n'est pas connue, ce qui est le cas de POU1F1. Cette option semblait donc inadéquate pour l'utilisation future de cette protéine.

Il existe cependant d'autres facteurs qui permettent de limiter le risque de formations des corps d'inclusion [Burgess, 2009] :

- l'utilisation d'une autre souche bactérienne
- l'augmentation de la surface de milieu de culture en contact avec l'air (meilleure aération des bactéries)
- la diminution de la vitesse d'agitation pendant la culture
- la variation de la température de culture au moment de l'induction, notamment par diminution de cette température.

Beaucoup de protéines formant, initialement, des corps d'inclusion, ont montré une certaine solubilité lorsqu'elles étaient produites à basse température [Bishai et al., 1987]. Les bactéries *E. coli* sont capables de synthétiser des protéines dans une gamme de température allant de 10°C à 43°C. Des cultures de bactéries contenant le plasmide POU1F1-P76L ont donc été réalisées à différentes températures (15°C, 25°C et 30°C). Les bactéries de ces cultures ont ensuite été lysées et un aliquot a été migré sur gel de polyacrylamide. Cette gamme de température a permis de déterminer que la formation des corps d'inclusion était fortement limitée lorsque les bactéries sont induites à une température de 25°C.

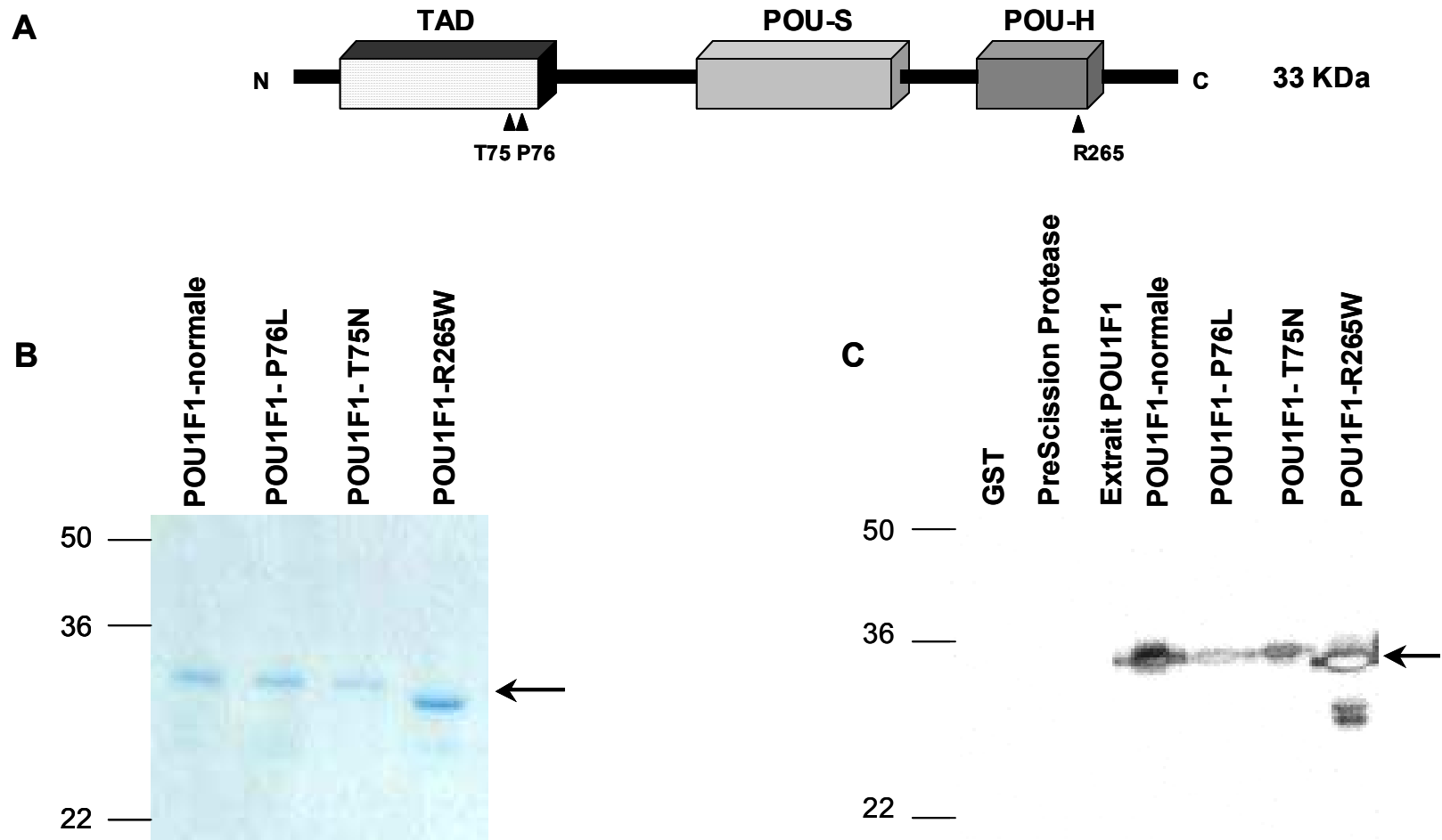


Figure 33 : Coloration au bleu de coomassie et western blot de 4 protéines POU1F1 recombinantes produites dans *E. Coli* et purifiées (normale, P76L, T75N, R265W). A, Représentation schématique de la protéine POU1F1. L'arginine 265 qui entraîne la perte de liaison à l'ADN lorsqu'il est changé en tryptophane ainsi que les deux acides aminés mutés chez les patients présentant un IGHD (thréonine 75 et proline 76) sont indiqués (têtes de flèche). Les différentes protéines purifiées sont migrées sur gel de polyacrylamide 12% puis colorées au bleu de coomassie (B) ou transférées sur membrane de nitrocellulose et hybridées avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-POU1F1 (C). Un extrait nucléaire de HEK293 transfectées avec POU1F1 est utilisé comme témoin positif. La GST et la PreScission protease sont utilisées comme témoins négatifs.

Cependant, les bactéries se multiplient moins vite à cette température, il a donc fallu trouver les conditions permettant à la fois de conserver la solubilité des protéines tout en augmentant les rendements. Une gamme DO avant induction à l'IPTG a été réalisée et a montré que, dans le cas de la production de protéine POU1F1-P76L, la DO nécessaire à une production optimale était de 0,4.

De la même manière, les conditions de culture ont été mises au point pour les protéines mutantes POU1F1-T75N et R265W (**Tableau 12**).

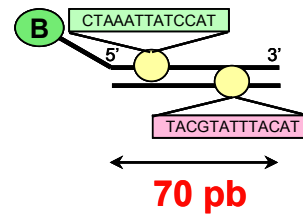
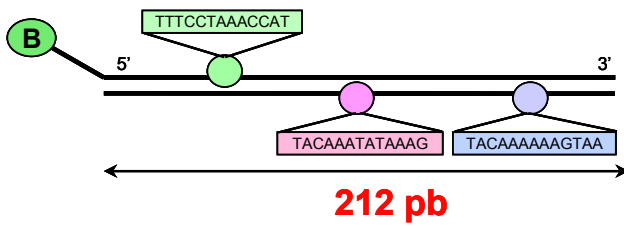
	Volume de culture	DO d'induction	Température d'induction	Temps d'induction	Quantité obtenue
POU1F1-normale	1 L	0,1-0,2	37°C	3 heures	280 µg
POU1F1-P76L	1,4 L	0,3-0,4	25°C	4 heures	400 µg
POU1F1-T75N	1 L	0,3-0,4	25°C	4 heures	170 µg
POU1F1-R265W	1 L	0,3-0,4	15°C	4 heures	170 µg
GST	200 ml	0,4	37°C	3 heures	3 mg

Tableau 12 : Récapitulatif des rendements obtenus pour les différentes protéines recombinantes générées. Les conditions de production et d'induction sont indiquées.

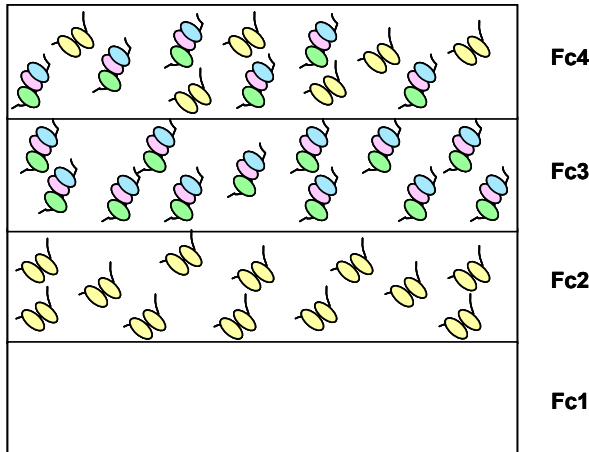
Tout comme la protéine POU1F1-R265W, connue pour perdre son interaction avec l'ADN, les conditions de culture des deux protéines mutantes P76L et T75N sont différentes de celle de la protéine POU1F1-normale. Ces résultats suggèrent non seulement que ces mutations entraînent un changement de conformation mais aussi que ces mutations sont toxiques lorsque ces protéines sont produites chez la bactérie *E. coli*.

Les différentes protéines POU1F1 ainsi produites et purifiées ont été concentrées et dialysées dans un tampon HBS-EP pour l'étude de l'interaction ADN-protéines sur le BIAcore. Un aliquot de chacune des purifications a été migré sur gel pour vérifier la pureté de chacune des préparations et un western blot a également été réalisé avec un anticorps polyclonal spécifique de la partie N-terminale de POU1F1 (**Figure 33B**).

A



B



C

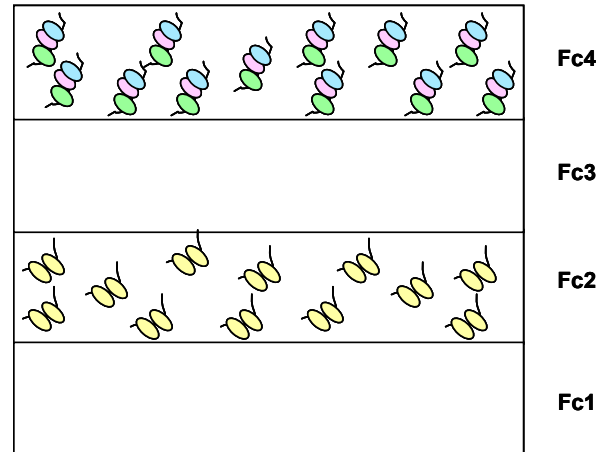


Figure 34 : Stratégie d'étude de l'interaction ADN-protéines. A, Les séquences d'ADN biotynilés (B : biotine) correspondant soit aux trois sites de liaison de POU1F1 du LCR *GH* (à gauche), soit aux deux sites POU1F1 du promoteur *GH* (à droite) sont sous forme de double brins. Ces séquences sont ensuite fixées de manière covalente sur les puces de streptavidine (B et C). B, Les quatre canaux (ou *Flow cell*, Fc) sont utilisés pour une étude d'interaction ADN-protéines. Le canal 1 sert de contrôle négatif, la séquence d'ADN de 70 pb est utilisée sur le canal 2, la séquence de 212 pb est fixée sur le canal 3, les deux séquences ADN sont utilisées sur le canal 4. C, Pour l'étude cinétique, les canaux 1 et 3 servent de contrôles négatifs, les canaux 2 et 4 sont utilisés pour la fixation des ADN de 70 pb et de 212 pb respectivement.

Etude d'interaction de POU1F1 sur les séquences d'ADN cibles

Une puce SA a été utilisée pour l'analyse de l'interaction ADN-protéines. Cette puce est constituée de quatre canaux (*Flow cell*, Fc). Le premier de ces canaux reste intact et permet la soustraction du bruit de fond observé sur ce canal par rapport aux autres canaux. Le deuxième canal (Fc2) est utilisé pour la fixation des 70 paires de bases contenant les deux sites de liaison de POU1F1 du promoteur *GH* à la concentration de 500 nM. Les 212 paires de bases comprenant les trois sites de liaison de POU1F1 situés au niveau du site HSI du LCR sont immobilisés sur le troisième canal (Fc3) à la même concentration. Afin de mimer la formation de la boucle, les deux séquences cibles sont fixées de manière équimolaire à la surface du quatrième canal (Fc4); cette fixation aléatoire permet de simuler le rapprochement physique entre le promoteur *GH* et le LCR (**Figure 34**).

Une fois l'immobilisation de l'ADN effectuée, une ligne de base est définie pour chacun des canaux.

Interaction ADN-protéines

Les protéines POU1F1 purifiées sont ensuite injectées sur la puce pour étudier l'interaction ADN-protéine. Les protéines sont utilisées dans un tampon d'injection composé de HBS-EP enrichi avec 1 mM de MgCl₂ pour favoriser la liaison avec l'ADN. La protéine POU1F1 normale est connue pour interagir avec les cibles ADN immobilisées sur la puce. Cette interaction est bien retrouvée en utilisant le BIAcore. Une interaction correspondant à 25 et à 38 RU est retrouvée sur le promoteur *GH* et sur le LCR respectivement (**Figures 35 A et B**, en bleu).

En contrôle, POU1F1-R265W, dont la mutation dans l'homéodomaine entraîne la perte de l'interaction de la protéine avec l'ADN, a été utilisée. Aucune réponse n'a pu être observée (**Figure 35 A et B**, en rouge sur les sensorgrammes). Un deuxième contrôle négatif, la GST, a été testé et ne montre pas de fixation sur les cibles ADN du promoteur *GH* et du LCR (données non montrées).

Un troisième contrôle, correspondant au promoteur *GH* dont les deux sites de liaison à POU1F1 ont été remplacés par une séquence aspécifique, a été utilisé.

Aucune interaction n'a pu être observée entre la protéine POU1F1 normale et l'ADN muté (résultats non montrés).

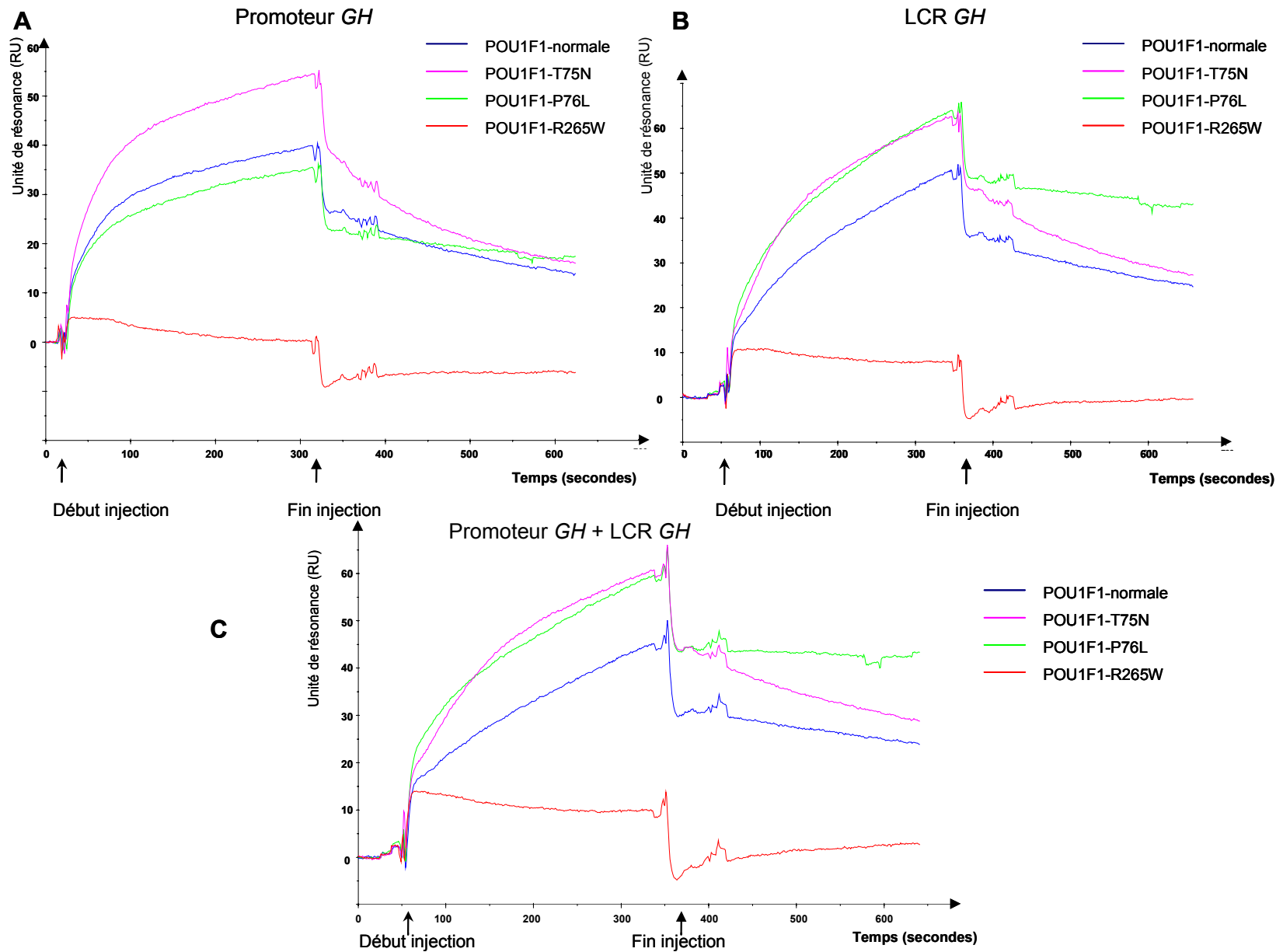


Figure 35 : Etude de l'interaction entre différents variants de la protéine POU1F1 et leurs cibles ADN (promoteur *GH* et LCR *GH*). L'interaction des protéines POU1F1 normale (bleu), p.Pro76Leu (vert), p.Thr75Asn (rose) et p.Arg265Trp (rouge) est testée sur le promoteur *GH* (A), sur le LCR *GH* (B) et sur le mélange promoteur *GH* et LCR *GH* (C). Le début et la fin de l'injection sont indiqués. Les protéines sont en contact avec l'ADN pendant cinq minutes.

Ces contrôles positifs (POU1F1-normale sur les séquences du promoteur *GH* et du LCR) et négatifs (R265W, GST et sites de liaison à l'ADN muté) confirment la spécificité de liaison de POU1F1-normale sur ses séquences cibles et ont également permis de valider l'utilisation de la technique du BIAcore pour étudier les effets des mutations POU1F1-P76L et T75N.

La mutation POU1F1-P76L ne semble pas modifier l'interaction avec l'ADN puisque les réponses obtenues sur le promoteur *GH* (23 RU) et sur le LCR (49 RU) sont similaires à celles observées en utilisant la forme normale de la protéine (**Figures 35 A et B**, en vert). De même, les résultats obtenus pour la protéine T75N sont comparables à ceux de la protéine normale (31 RU pour le promoteur *GH* et 43 RU pour LCR) (**Figures 35 A et B**, en rose).

En présence des deux séquences cibles (promoteur *GH* et LCR sur le canal 4), il n'a pas été observé de différence significative entre l'interaction de la protéine normale (37 RU) et les protéines mutantes P76L et T75N (46 RU et 41 RU respectivement) (**Figure 35C**). L'interaction observée en présence de ces deux cibles ADN sont plus proches des valeurs obtenues en présence de la séquence cible correspondant au LCR.

Il est à noter que les réponses obtenues sur le LCR sont toutes supérieures à celles obtenues sur le promoteur *GH* et cela, quelque soit la protéine étudiée. Ces résultats peuvent traduire la présence du site de liaison supplémentaire au niveau du LCR.

Le temps de dissociation spontanée a été mesuré pour les protéines normale et mutées. Sous un flux constant de HBS-EP à 5 µl/min, les protéines se sont dissociées spontanément jusqu'à ce que la ligne de base soit retrouvée. Bien que les réponses d'interaction soient similaires, il semble que la protéine normale se dissocie plus lentement du promoteur *GH*, du LCR et des deux cibles ADN immobilisées que la protéine P76L (**Tableau 13**) montrant ainsi une stabilité sur l'ADN plus importante de la protéine normale sur une longue durée. Le temps de dissociation spontanée de la protéine T75N est similaire à celui observé pour P76L au niveau du LCR (38 minutes) mais, au niveau du promoteur *GH*, il est plus proche de celui de la protéine normale (supérieure à 88 minutes).

Les mutations p.Pro76Leu et p.Thr75Asn étant retrouvées dans le TAD de POU1F1, il n'est pas surprenant que l'interaction avec l'ADN ne soit pas perdue et que les réponses soient similaires à celles de la protéine normale. En revanche, les

différences de dissociation spontanée observées entre la protéine normale et les protéines mutées P76L et T75 au niveau du LCR *GH* suggèrent que la mutation entraîne une différence de comportement de la protéine sur ses sites de liaison. Cette différence de « stabilité » sur l'ADN pourrait être à l'origine d'une modification dans le recrutement des partenaires nécessaires à l'expression physiologique de la GH chez l'homme.

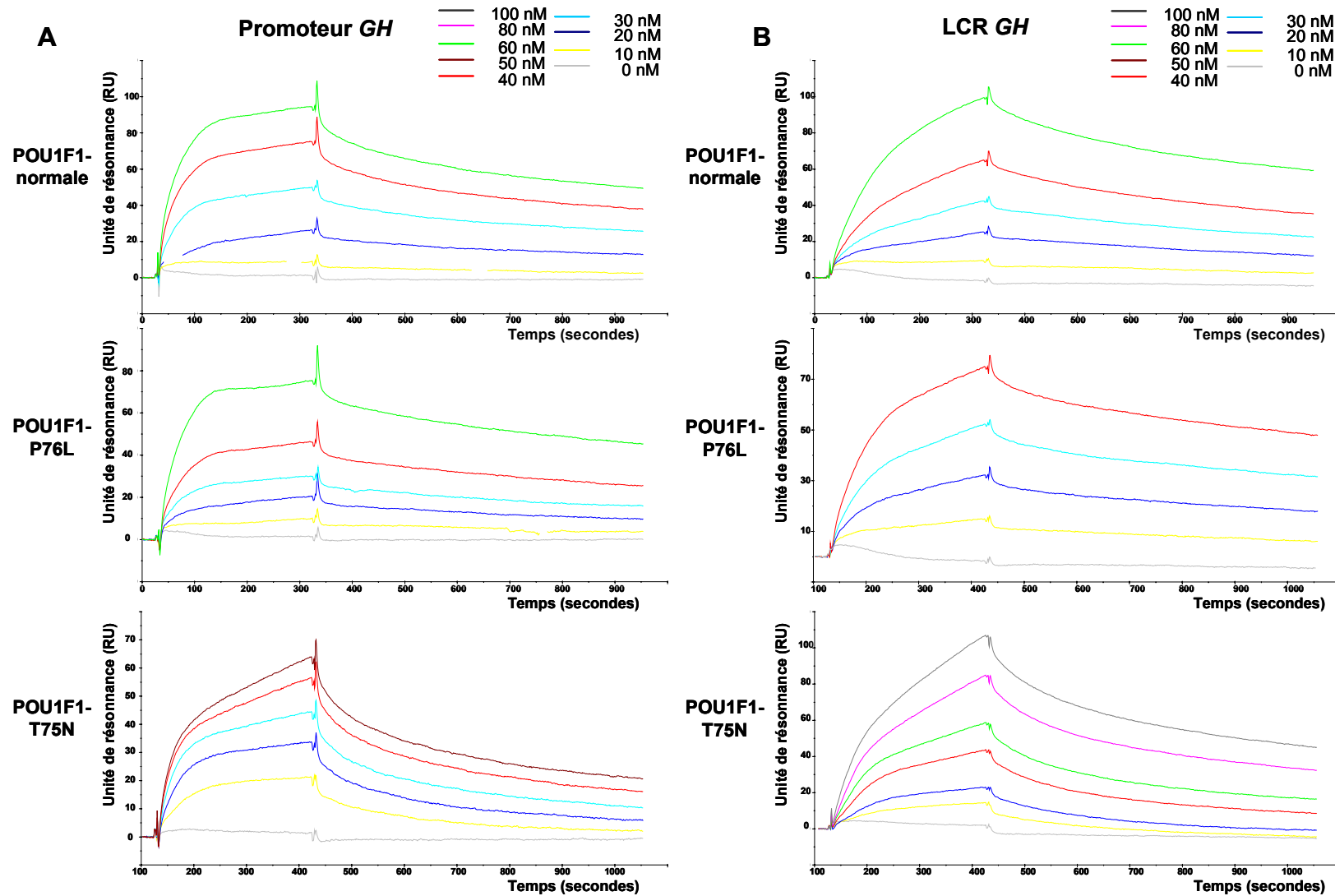


Figure 36 : Etude cinétique de l'interaction entre les protéines POU1F1-normale, P76L et T75N et de leurs cibles ADN. Les cinétiques ont été réalisées sur le promoteur *GH* (A) et sur le LCR *GH* (B) et avec les protéines POU1F1-normale (haut), P76L (milieu) et T75N (bas) avec cinq concentrations différentes au minimum (0 nM, gris clair; 10 nM, jaune; 20 nM, bleu; 30 nM, bleu clair; 40 nM, rouge; 50 nM, marron; 60 nM, vert; 80 nM, rose; 100 nM, gris foncé). Une expérience représentative parmi trois expériences indépendantes est présentée pour chaque condition.

	Interaction ADN-protéines			Dissociation		
	Promoteur <i>GH</i>	LCR	Promoteur <i>GH</i> + LCR <i>GH</i>	Promoteur <i>GH</i>	LCR	Promoteur <i>GH</i> + LCR <i>GH</i>
POU1F1-normale 50 mM	25 RU	38 RU	37 RU	2 heures	76 minutes	79 minutes
POU1F1-P76L 50 mM	23 RU	49 RU	46 RU	41 minutes	37 minutes	33 minutes
POU1F1-T75N 50 mM	31 RU	43 RU	41 RU	> 88 minutes	38 minutes	88 minutes
POU1F1-R265W 50 mM	0 RU	0 RU	0 RU	0	0	0
GST	0 RU	0 RU	0 RU	0	0	0

Tableau 13 : Etude de l'interaction des différents variants de la protéine POU1F1 avec les séquences ADN du promoteur *GH* et du LCR.

RU : unité de résonance

Cinétique

Pour les études de cinétique, l'ADN est immobilisé différemment sur la puce. En effet, afin de pouvoir obtenir ces cinétiques, les canaux 1 et 3 restent vierges de tout ADN afin de soustraire le bruit de fond observés tandis que les canaux 2 et 4 sont utilisés pour l'immobilisation du promoteur *GH* et du LCR respectivement (**Figure 34C**). Cette étude cinétique permet de déterminer les constantes d'affinité entre deux molécules (ici, ADN et protéine) qui sont directement liées aux vitesses d'association et de dissociation en courte durée déterminée.

Les cinétiques ont été réalisées avec une gamme de concentration allant de 0 à 100 nM de protéines. Chacune des protéines a été injectée sur la puce pendant 5 minutes à un flux de 5 µl/min (**Figure 36**). Les constantes d'association (K_A) et de dissociation (K_D) ont été déterminées pour les protéines POU1F1-normale, P76L et T75N.

Sur le promoteur *GH*, l'affinité est similaire pour les trois protéines ($K_D = 1,84.10^{-8}$ M, $2,17.10^{-8}$ M et $5,86.10^{-8}$ M respectivement) (**Tableau 14**).

En revanche, au niveau du LCR, les constantes de dissociation sont différentes. En effet, la protéine normale ($K_D = 1,53.10^{-6}$ M) semble avoir moins d'affinité pour cette cible ADN contenant les trois sites de liaison à POU1F1 que les protéines POU1F1-P76L et T75N ($K_D = 4,3.10^{-7}$ M et $1,47.10^{-7}$ M respectivement) (**Tableau 14**).

Bien que le promoteur *GH* possède un site de fixation à POU1F1 de moins par rapport au LCR, l'affinité des trois protéines est plus importante pour le promoteur *GH* que pour le LCR.

Les deux protéines mutantes montrent des résultats similaires non seulement au niveau de leurs interactions avec l'ADN mais aussi pour leurs cinétiques tant au niveau du promoteur *GH* que du LCR. La stabilité diminuée sur l'ADN observée avec la protéine POU1F1-P76L (révélée par le temps de dissociation spontanée diminuée) ainsi que la différence de cinétique sur le LCR des deux protéines mutantes par rapport à la protéine POU1F1-normale, suggèrent une modification de la liaison due aux mutations. Ces différences pourraient contribuer au phénotype particulier d'IGHD observé chez les patients. En effet, il est possible que le recrutement des partenaires, au niveau de ces cibles ADN et en particulier au niveau du LCR, soit modifié.

	Promoteur <i>GH</i>			LCR		
	K_D	K_A	Chi ²	K_D	K_A	Chi ²
POU1F1-normale	$1,84.10^{-8}$ M	$5,43.10^7$ M ⁻¹	9,84	$1,53.10^{-6}$ M	$6,52.10^5$ M ⁻¹	4,58
POU1F1-P76L	$2,17.10^{-8}$ M	$4,61.10^7$ M ⁻¹	5,03	$4,3.10^{-7}$ M	$2,32.10^6$ M ⁻¹	3,81
POU1F1-T75N	$5,86.10^{-8}$ M	$1,71.10^7$ M ⁻¹	0,809	$1,47.10^{-7}$ M	$6,79.10^6$ M ⁻¹	2,02

Tableau 14 : Etude cinétique des différents variants de la protéine POU1F1 avec les séquences ADN du promoteur *GH* et du LCR.

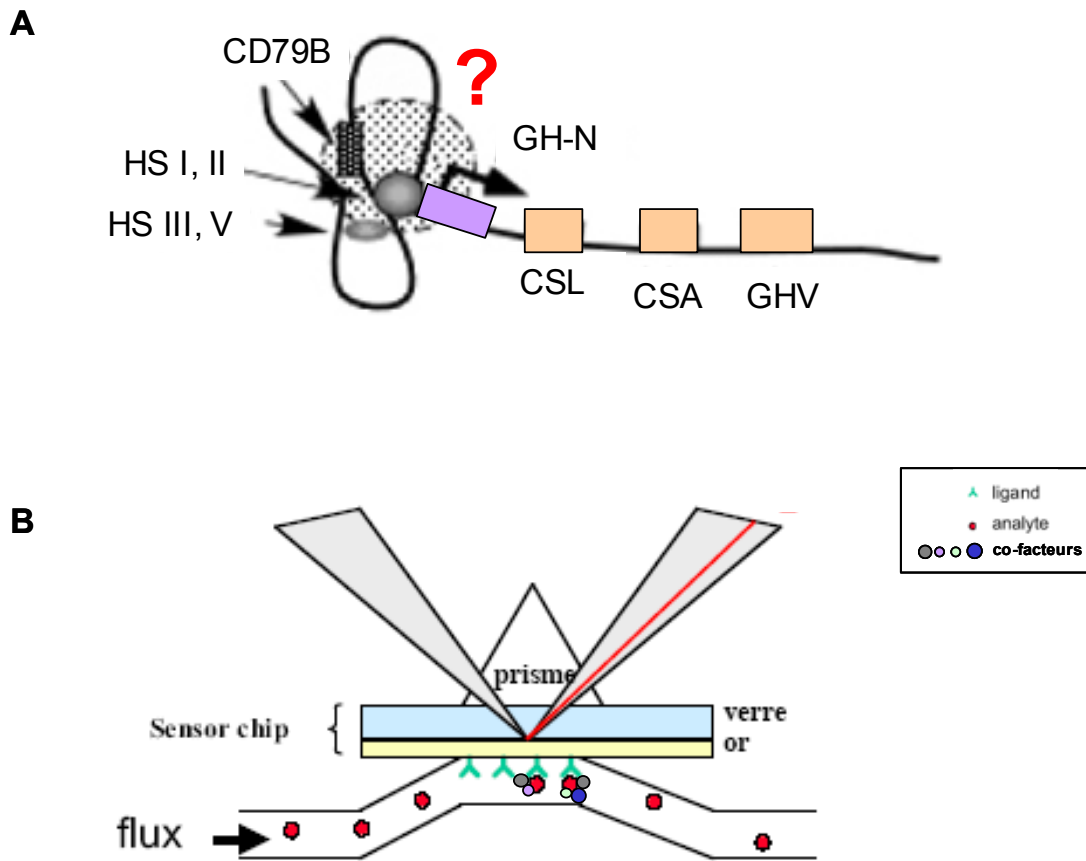


Figure 37 : Recherche de partenaires de la protéine POU1F1. A, Modèle de la boucle d'activation *GH-N* spécifique de la glande pituitaire. La composition du complexe protéique formé n'est pas encore connue. B, Approche utilisée pour la recherche de partenaires. Des extraits nucléaires de lignées cellulaires sont injectés sur la puce en présence de la protéine POU1F1, les complexes formés sont recueillis et analysés ultérieurement.
(D'après Ho *et al.*, 2008 et Plateforme Interaction biomoléculaire en temps réel, IFR83)

Recherche de partenaires de POU1F1

L'étude des interactions ADN-protéine a montré que les mutations n'entraînent pas de perte de liaison à l'ADN. Cependant, des différences de comportement ont été observées entre la protéine POU1F1-normale et les protéines POU1F1-P76L et POU1F1-T75N. L'hypothèse la plus probable est que les partenaires protéiques de POU1F1 au niveau du locus *GH* sont recrutés différemment en présence des mutations POU1F1-P76L et T75N par rapport à la protéine POU1F1-normale (**Figure 37**). Cette différence de comportement pourrait entraîner soit une perte des cofacteurs soit un gain de nouveaux partenaires.

Afin d'identifier les éléments du complexe probablement formé autour de POU1F1, nous nous sommes concentrés, dans un premier temps, sur l'identification des partenaires de POU1F1 normale. En effet, bien que certains partenaires de POU1F1 soient connus, ils sont néanmoins peu nombreux et peu ont été identifiés comme agissant au niveau du locus *GH*.

Pour cela, des extraits nucléaires de lignées cellulaires MCF-7 (lignées cellulaires de carcinome mammaire humain) et de lignées pituitaires murines (GFHT1, PIT1/0, PIT/Prl) ont été préparés et seront utilisés. Les cellules PIT1/0 et PIT/Prl sont des cellules pituitaires murines exprimant Pou1f1 qui ont été immortalisées soit à un stade précoce du développement pituitaire lors duquel les trois hormones Gh, Prl et Tsh ne sont pas encore exprimées (PIT1/0) soit à un stade plus tardif (PIT/Prl) lors duquel la Prl est exprimée [Sizova et al., 2010].

Après injection d'un mélange de protéines purifiées et d'extraits nucléaires, les protéines interagissant avec l'ADN peuvent être décrochées, récupérées (« Recovery ») puis identifiées par spectrométrie de masse. La quantité de protéines récupérées est estimée par la formule 1000 RU = 1 ng de protéine.

Mise au point et validation de l'approche « Recovery »

Afin de réaliser les mises au point, la protéine POU1F1 normale a d'abord été utilisée seule sur une puce sur laquelle l'ADN du promoteur *GH* a été fixé sur les quatre canaux.

Le tampon de régénération initialement utilisé était du SDS 0,1%. Or le SDS est un détergent non compatible avec la digestion trypsique nécessaire avant toute

analyse en spectrométrie de masse. De nombreux tampons d'élution généralement utilisés sur le BIAcore, comme la soude ou l'acide acétique, ont été testés mais aucun ne permettait une bonne efficacité. Finalement, le tampon d'élution utilisé est de l'AALS à 0,1% qui est un détergent équivalent au SDS mais qui a la particularité de pouvoir être digéré par du TFA, ce qui rend ce tampon compatible avec la spectrométrie de masse.

Dans un second temps, l'utilisation du HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% (v/v) P20) comme tampon de course s'est avéré être gênant puisque le P20 (Tween 20) de ce tampon contamine l'éluat et perturbe l'analyse notamment par la présence de très nombreux pics caractéristiques de polymères. Dès lors, un nouveau tampon de course a été utilisé, du HBS-N enrichi avec de l'EDTA et de l'AALS à faible concentration (0,001%).

Un cycle de recovery est composé de plusieurs étapes. Initialement, une mesure de la ligne de base est effectuée (**Figure 38A**, point 1) puis les protéines sont injectées sur la puce. Un second point de mesure est réalisé à la fin de l'injection (point 2). La puce est ensuite lavée afin d'éliminer les protéines non spécifiques de l'ADN cible. Une troisième mesure de signal permet à cette étape de déterminer la quantité de protéines fixées spécifiquement sur la puce (point 3). De l'AALS est utilisé dans le but de décrocher les protéines d'intérêt (Régénération). Puis une bulle d'air est injectée dans le système microfluidique pour permettre d'éluer et de récupérer les protéines dans un tube (Récupération). Une dernière mesure (point 4) permet de déterminer de manière théorique la quantité de protéines éluées (1000 RU = 1 ng de protéine). La quantité de protéines récupérées lors d'un cycle étant insuffisante pour une identification par spectrométrie de masse, dix cycles successifs sont réalisés. Une expérience contrôle (dix cycles) a été réalisée avec la protéine POU1F1 normale sur l'ADN du promoteur *GH*. Pour cela, 400 ng de protéines purifiées ont été injectées, 1,6 ng se sont fixées (point 3) et 1,3 ng de protéines ont été récupérées (point 4).

L'éluat a été digéré avec du TFA (élimination de l'AALS) puis par la trypsine (digestion protéique) et a été analysé sur MALDI.

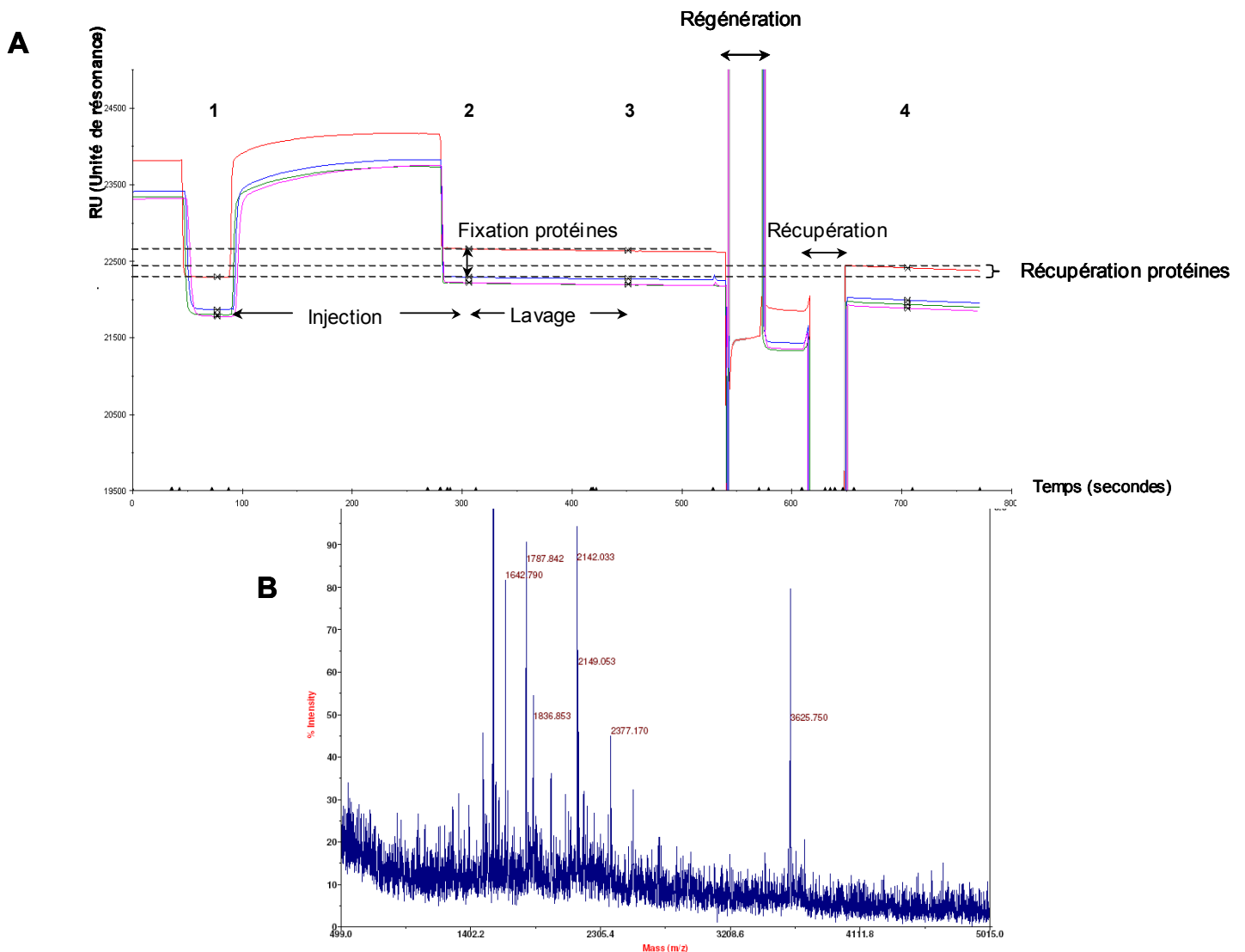


Figure 38 : Mise au point expérimentale pour la recherche de co-facteurs de POU1F1.

A, La protéine POU1F1 est injectée seule sur l'ADN fixé sur la puce. Ici, la séquence ADN correspondant au promoteur *GH* est immobilisée sur les quatre canaux. Les différentes étapes de la récupération de protéines sont indiquées sur le sensorgramme. B, Une fois les protéines récupérées, l'éluat est digéré par la trypsine puis analysé en spectrométrie de masse (MALDI). Les différents pics peptidiques (masse moléculaire indiquée en marron) ont permis l'identification de la protéine POU1F1 par analyse des banques de données Mascot.

Les analyses des banques de données (Mascot, Swissprot) ont permis d'identifier la protéine POU1F1 ce qui valide l'approche du couplage BIAcore / spectrométrie de masse (**Figure 38**).

« Recovery » à partir d'extraits nucléaires

Les extraits nucléaires de la lignée pituitaire murine GHFT1 ont été incubés à la concentration de 10 µg/ml avec la protéine POU1F1 normale purifiée à 200 nM. L'AALS 0,1% a permis l'élution de 15 ng de protéines fixées sur l'ADN en dix cycles de récupération. Après traitement, cet éluat a été analysé. Malheureusement, aucune protéine, ni même POU1F1, n'a pu être identifiée malgré la présence de très nombreux pics de faible intensité.

A ce jour, les partenaires de POU1F1 n'ont pas pu être caractérisés. Des mises au point sont encore nécessaires pour l'obtention de résultats significatifs. Pour cela, la quantité de protéines récupérées sur le BIAcore pourrait être augmentée ou bien l'identification des partenaires pourrait également être réalisée sur un spectromètre de masse plus sensible (orbitrap).

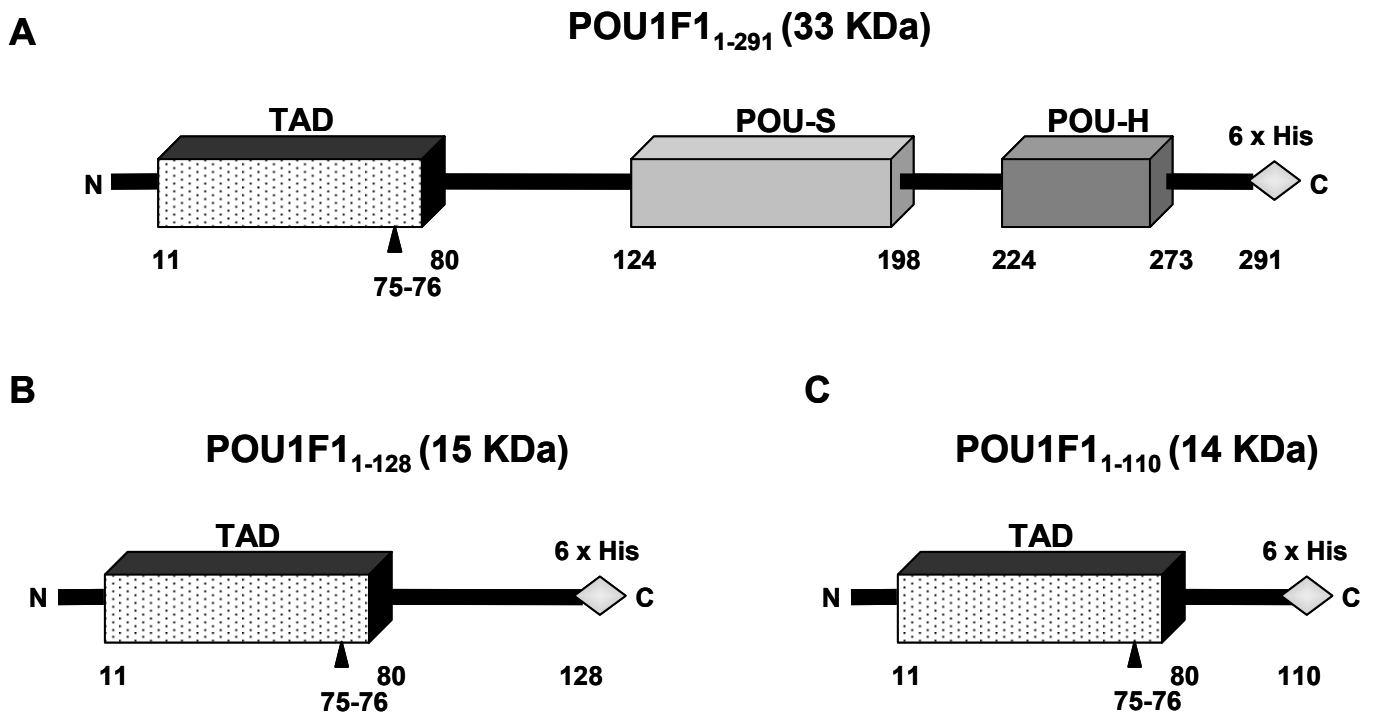


Figure 39 : Représentation schématique des différentes protéines POU1F1 recombinantes utilisées pour des tentatives de cristallisation. A, L'ADNc de *POU1F1* a été cloné dans le vecteur pGEX5-CT-TOPO permettant la production d'une protéine POU1F1 portant en C-terminal une étiquette constituée de six résidus histidine. Les différents domaines sont représentés : le domaine de transactivation (TAD, représenté par un rectangle avec pointillé) dans lequel ont été identifiées les mutations T75N et P76L, ainsi que les deux domaines POU (POU-S et POU-H) représentés par des rectangles gris clair et gris foncé respectivement. Des constructions permettant la production de peptides de 128 acides aminés (B) et de 110 acides aminés (C) comprenant seulement le domaine de transactivation ont été réalisées.

2.3 Etude de la structure tridimensionnelle du domaine de transactivation de POU1F1

Seuls les domaines POU de la protéine POU1F1 ont été cristallisés à ce jour [Jacobson et al., 1997]. Or les deux mutations identifiées chez des patients présentant un IGHD (p.Pro76Leu et p.Thr75Asn) sont localisées dans le TAD. Nous avons débuté une étude de cristallisation du TAD (normal et mutés) dans le but de comprendre les effets de ces mutations sur la structure de ce domaine.

Afin de pouvoir déterminer la structure du TAD de POU1F1 (acides aminés 11 à 80), nous avons purifié un peptide contenant les 128 premiers acides aminés de POU1F1 (**Figure 39B**). Puis, dans un second temps, à partir des données de la structure secondaire de POU1F1, nous avons réalisé une construction plus courte comprenant les 110 premiers acides aminés (**Figure 39C**) qui semblaient plus favorables à la cristallisation.

Le TAD de POU1F1 normal (POU1F1₁₋₁₂₈ normale) a été produit et purifié à partir des bactéries *E. coli* BL21AI comme les mutants et les formes plus courtes de 110 acides aminés (POU1F1₁₋₁₁₀).

Trois chromatographie successives sont nécessaires à l'obtention des protéines purifiées. Une première chromatographie d'affinité est réalisée (**Figure 40**) puis différentes fractions sont migrées sur gel d'acrylamide. Les fractions d'intérêt (fractions 32 à 38, **Figure 40, bas**) sont à nouveau purifiées par chromatographie échangeuse d'anions (**Figure 41A**). Une dernière chromatographie d'exclusion est réalisée (**Figure 41B**). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide afin de vérifier la pureté des protéines obtenues (**Figure 42**).

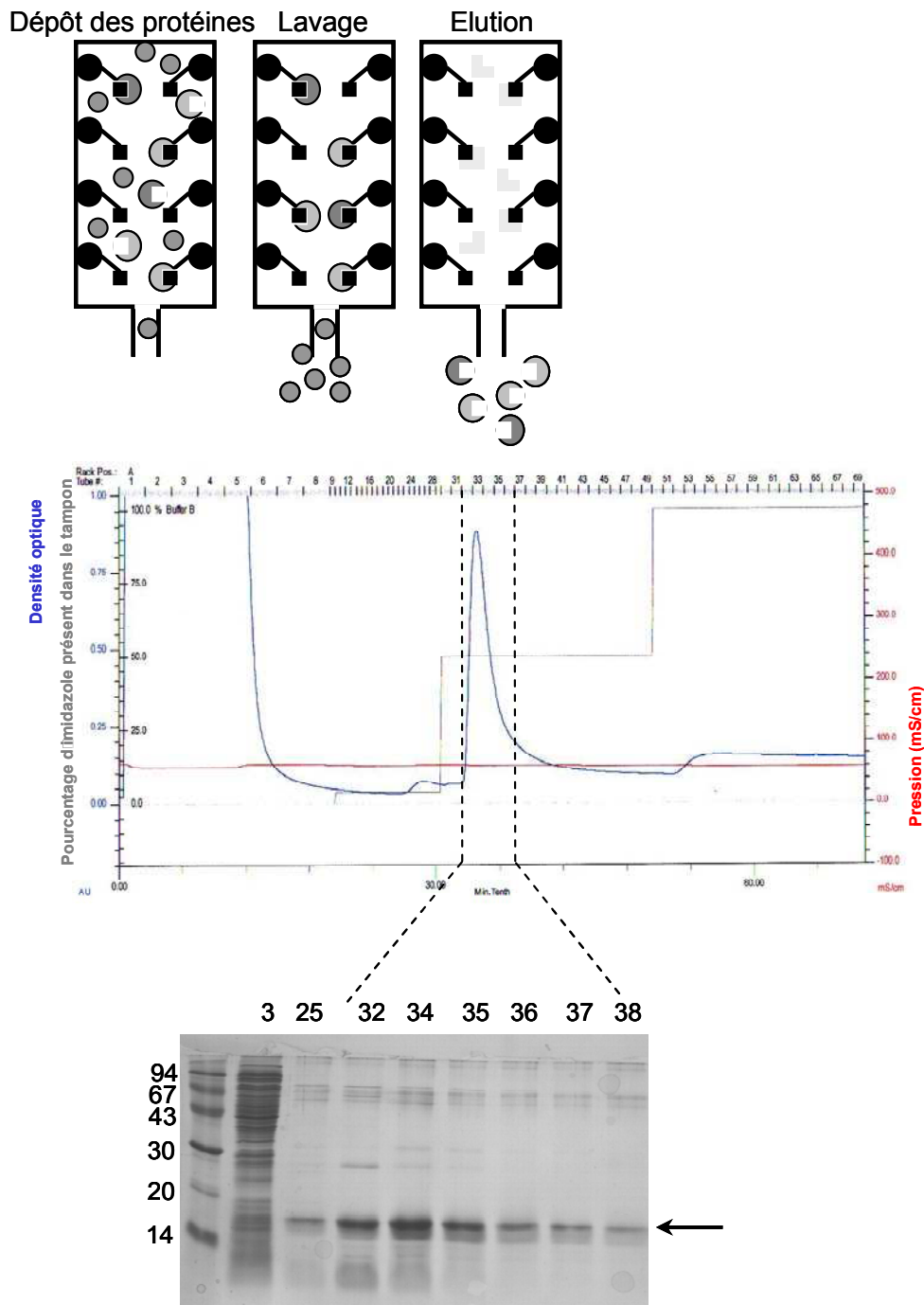
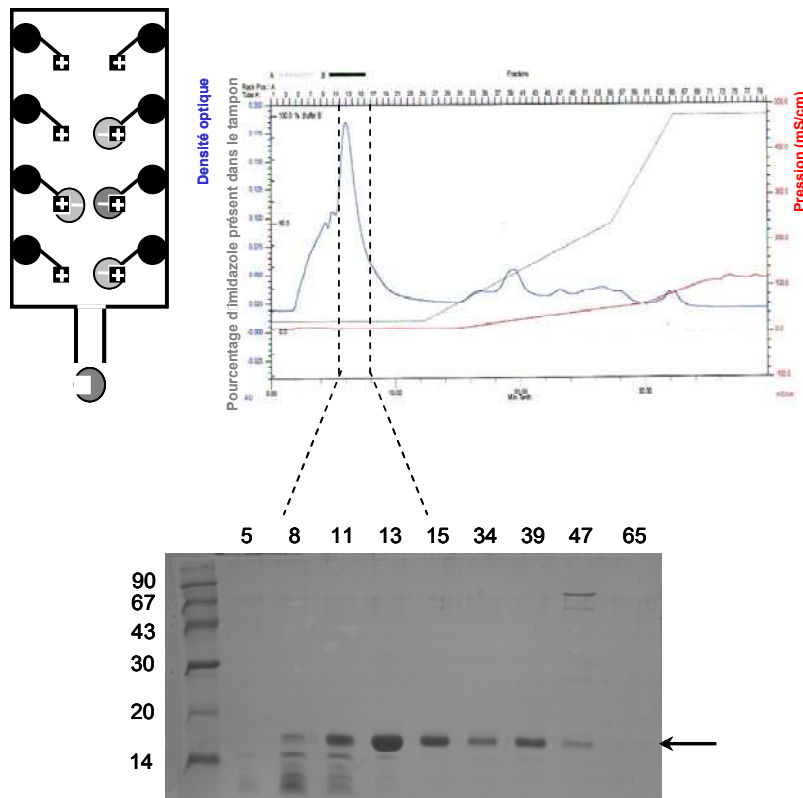


Figure 40 : Purification du peptide POU1F1₁₋₁₂₈ normal recombinant par chromatographie d'affinité. Les protéines produites en bactéries *E. Coli* sont déposées sur une colonne d'affinité constituée d'une résine de nickel. La colonne est ensuite lavée permettant ainsi de retenir spécifiquement les protéines étiquetées histidine. Elles sont ensuite éluées grâce à de l'imidazole et collectées par fraction de petit volume. La densité optique est suivie au cours du temps. Les protéines de certaines des fractions sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide. La fraction 3 correspond aux protéines non retenues. Les fractions 32 à 38 ont été collectées et correspondent au pic de densité optique observé.

A



B

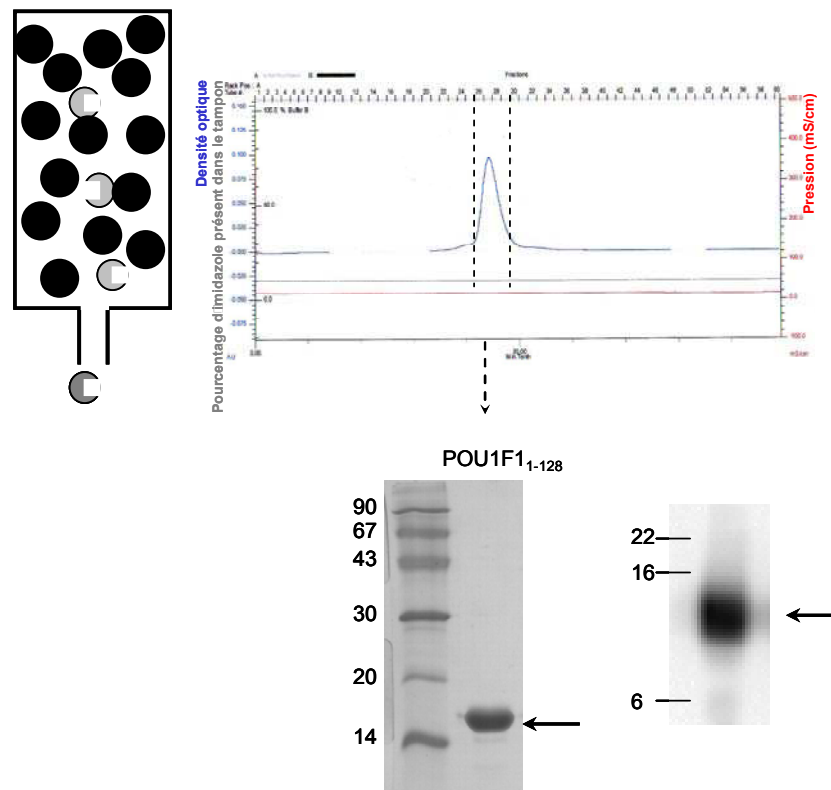


Figure 41 : Purification du peptide POU1F1₁₋₁₂₈ normal recombinant par chromatographie échangeuse d'anions et d'exclusion. A, Les protéines contenues dans les fractions précédemment collectées sont purifiées sur colonne échangeuse d'anions. Après purifications, des aliquots de protéines sont à nouveau migrés sur gel. Les fractions 8 à 15 correspondent aux fractions contenant le peptide de 15 KDa. On note la présence du peptide dans les fractions 34, 39 et 47, ces fractions ne sont pas retenues en raison de la faible quantité de peptide contenu. B, Les fractions 8 à 15 sont groupées et purifiées sur une colonne d'exclusion. Le pic unique constituant les fractions 26 à 29 correspond au peptide POU1F1₁₋₁₂₈ normal, ce qui est confirmé par coloration au bleu de coomassie (en bas à gauche) et par révélation par western blot avec un anticorps polyclonal de chèvre spécifique de la partie N-terminale de POU1F1 (en bas à droite). Les flèches indiquent la position du peptide d'intérêt.

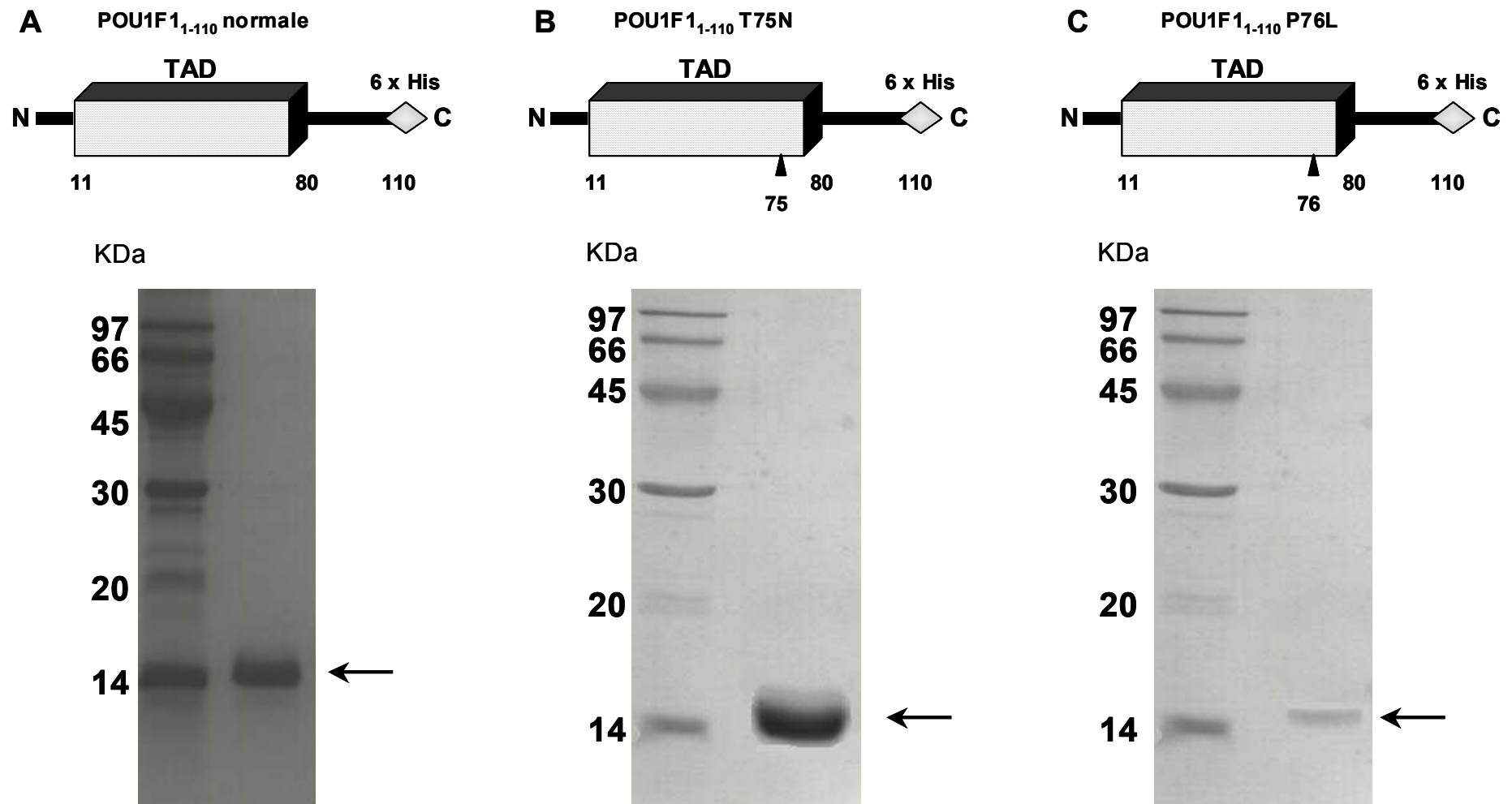


Figure 42 : Purification des peptides recombinants POU1F1₁₋₁₁₀ normal, POU1F1₁₋₁₁₀ P76L et POU1F1₁₋₁₁₀ T75N étiquetés histidine. Après purification par chromatographie d'exclusion, la pureté des peptides POU1F1₁₋₁₁₀ normale (A), mutée T75N (B) et P76L (C) de 14 KDa a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (coloration au bleu de coomassie). On note la pureté de chacune des préparations protéiques et la plus faible quantité du peptide POU1F1₁₋₁₁₀ P76L par rapport aux peptides normal et T75N.

Les gels d'acrylamide de POU1F1₁₋₁₁₀ normale (**Figure 42A**), POU1F1₁₋₁₁₀ T75N (**Figure 42B**) et POU1F1₁₋₁₁₀ P76L (**Figure 42C**) sont présentés. Bien que, pour chacune des constructions, les conditions de culture aient été mises au point pour obtenir une quantité optimale de protéines, on note le faible rendement du peptide POU1F1₁₋₁₁₀ P76L.

Au total, 672 conditions de cristallisation ont été testées pour POU1F1₁₋₁₂₈ normale, 864 conditions pour POU1F1₁₋₁₁₀ normale, 480 conditions pour POU1F1₁₋₁₁₀ T75N et 96 conditions pour POU1F1₁₋₁₁₀ P76L (**Tableau 15**). Les gouttes ont ensuite été observées régulièrement au microscope et certaines d'entre elles contenaient un précipité probablement d'origine protéique. La précipitation observée peut être un indicateur puisque les conditions pour la cristallisation sont parfois proches de celles de la précipitation. Plusieurs semaines après la mise en cristallisation, et malgré la précipitation présente dans une grande partie des puits, peu de cristaux ont pu être observés. Au total, onze cristaux ont été congelés dans la solution cryoprotectante adéquate (**Tableau 16**). Les signaux obtenus par synchrotron ont révélé que les cristaux n'étaient pas de nature protéique mais de nature saline.

A ce jour, aucune des conditions testées, et cela quelque soit le peptide étudié, n'a permis d'obtenir de cristal.

Peptide purifié	Concentration	Volume final	Volume de la goutte à cristalliser	Conditions testées
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	4,17 mg/ml	140 µl	1 µl	Crystal Screen (96 conditions)
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	4,56 mg/ml	260 µl	1 µl	Salt RX (96 conditions) Index (96 conditions)
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	3,4 mg/ml	450 µl	1 µl	ProComplex (96 conditions) Natrix (96 conditions) PEG suite (96 conditions) Crystal Screen (25°C) (96 conditions)
POU1F1 ₁₋₁₁₀ normal	4,47 mg/ml	120 µl	0,15 µl	ProComplex (96 conditions) Natrix (96 conditions) Salt RX (96 conditions) Crystal Screen (96 conditions) Index (96 conditions)
POU1F1 ₁₋₁₁₀ normal	4,2 mg/ml	120 µl	0,15 µl	Natrix (96 conditions) Index (96 conditions) Salt RX (96 conditions) Crystal Screen (96 conditions)
POU1F1 ₁₋₁₁₀ T75N	4 mg/ml	110 µl	0,15 µl	ProComplex (96 conditions) Natrix (96 conditions) Salt RX (96 conditions) Crystal Screen (96 conditions) Index (96 conditions)
POU1F1 ₁₋₁₁₀ P76L	0,1 mg/ml	20 µl	0,15 µl	Crystal Screen (96 conditions)

Tableau 15 : Tests de cristallisation réalisés. Les différents peptides synthétisés ont été déposés sur des plaques pour des tests de cristallisation en goutte assise. La constitution en agents précipitants pour chacun des kits utilisés est détaillée en annexe.

	Agent précipitant	Solution cryoprotectante
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	0,1M K Chloride 0,025 M Mg Chloride 0,05 M Na Cacodylate pH6.0 15% isopropanol	Agent précipitant + 30 % glycérol
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	0,1M Bis-Tris Propane pH7.0 4M Nitrate de sodium	Agent précipitant + 15% éthylène glycol
POU1F1 ₁₋₁₁₀ P76L	0,4M Ammonium Phosphate	Agent précipitant + 35% glycérol
POU1F1 ₁₋₁₁₀ P76L	20% isopropanol 0,1M acétate de sodium pH4.6 0,2M chlorure de calcium	Agent précipitant + 30% glycérol
POU1F1 ₁₋₁₁₀ P76L	10% PEG 20000 0,1M Bicine pH9.0 2% dioxane	Agent précipitant + 30% glycerol
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	0,02M chlorure de magnésium hexahydrate 0,05M PIPES pH7.5 4% PEG8000 0,001M Spermine 0,015M chlorure de magnésium hexahydrate 0,002M chlorure de barium dehydrate	Agent précipitant + 30% éthylène glycol
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	0,05M PIPES pH7.5 7% isopropanol 0,0005M spermine	Agent précipitant + 30 % glycérol
POU1F1 ₁₋₁₁₀ T75N	0,2M Mg formate	Agent précipitant + 30% éthylène glycol
POU1F1 ₁₋₁₁₀ T75N	3,4M 1,6 Hexanediol 0,1M Tris pH8.5 0,2M chlorure de magnésium	Agent précipitant
POU1F1 ₁₋₁₂₈ normal	0,02M chlorure de magnésium hexahydrate 0,04 M cacodylate de sodium trihydrate pH5.5 40% 2-méthyl-2,4-pentanediol 0,02M chlorure hexamine de cobalt (III)	Agent précipitant
POU1F1 ₁₋₁₁₀ T75N	0,2M acetate d'ammonium 0,1M bis-Tris pH5.5 45% v/v MPD	Agent précipitant

Tableau 16 : Conditions de cristallisation et solutions cryoprotectantes utilisées pour l'analyse des cristaux observés.

DISCUSSION

Analyse génétique

L'expression de nombreux gènes est nécessaire au développement de la glande pituitaire et à son fonctionnement. D'autres le sont aussi au niveau de l'axe somatotrope notamment pour permettre la synthèse de la GH et son action sur ses tissus cibles. Certains d'entre eux ont été impliqués dans les maladies de la croissance. En effet, des anomalies génétiques conduisant au moins à un déficit en hormone de croissance ont été identifiées dans les gènes *GH*, ***GHR***, *GHRHR*, ***GHSR***, *HESX1*, ***LHX3***, ***LHX4***, *PROP1*, *POU1F1*, *SOX3*, *SOX2* et *OTX2*. Les recherches menées au laboratoire ont permis d'impliquer, pour la première fois, certains de ces gènes en pathologie humaine (en gras) [Amselem et al., 1989; Pantel et al., 2006; Netchine et al., 2000; Machinis et al., 2001]. A ce jour, un défaut moléculaire a été identifié chez seulement 12% des patients dont les prélèvements sont stockés dans notre banque ADN de déficit pituitaires. D'autres gènes intervenants au cours du développement hypophysaire sont donc impliqués dans l'apparition d'un retard de croissance. Une approche « gènes candidats » s'appuyant sur les données apportées par les modèles d'animaux invalidés a déjà permis d'impliquer certains gènes du développement pituitaire en pathologie humaine. Par cette approche, il est possible de constituer une cohorte de patients ayant un phénotype proche de celui observé chez le modèle animal et de tester le gène d'intérêt à la recherche de mutations. Pour cela, il est nécessaire de prendre en compte la nature du déficit en GH (IGHD ou CPHD), de l'anatomie de la glande pituitaire à l'IRM (antéhypophyse, post-hypophyse et tige pituitaire), et de l'existence éventuelle d'anomalies extra-pituitaires. Deux gènes candidats ont ainsi été étudiés au cours de ce travail, *SIX6* chez 74 patients présentant un déficit hypophysaire associés à une antéhypophyse hypoplasique dont certains présentaient également des anomalies oculaires et *LHX2* chez 76 patients présentant un déficit pituitaire, une post-hypophyse ectopique ou non visible et des anomalies oculaires.

L'étude des deux gènes candidats, *SIX6* et *LHX2*, n'a pas permis l'identification de mutation causale. Si ces deux gènes sont impliqués en pathologie, les mutations doivent être extrêmement rares. De plus, bien que les modèles animaux nous permettent de mieux comprendre le développement de la glande pituitaire et l'implication des facteurs de transcription dans les maladies de la croissance, il est possible que le phénotype observé chez les souris invalidées soit

différent de celui qui sera retrouvé chez un patient. Parmi les modèles animaux, peu présentent spontanément des mutations ponctuelles, la plupart de ces modèles sont issus d'inactivation fonctionnelle d'un gène. Or, chez l'homme, les délétions homozygotes de gènes sont extrêmement rares et la majorité des anomalies moléculaires impliquées en pathologie humaine sont des mutations ponctuelles (faux-sens, non-sens, décalage du cadre de lecture), ceci pourrait expliquer les différences phénotypiques observées entre les espèces.

Malgré l'analyse de cohortes homogènes, les mutations génétiques restent extrêmement rares comme en témoignent les publications de plus en plus nombreuses de résultats négatifs (*SIX6* [Zhang et al., 2002], *LHX2* [Desmaison et al., 2010; Mellado et al., 2010] ou *GHRH* [França et al., 2011]).

L'identification de deux nouvelles mutations de *LHX3* chez un même patient permet de corrélérer le phénotype du syndrome (déficit pituitaire, surdité, rigidité cervicale, scoliose et détresse respiratoire à la naissance) à ce gène et d'éliminer la mise en cause d'un ou de plusieurs autres gènes comme on pouvait le faire dans toutes les familles consanguines précédemment étudiées pour lesquelles le patient était porteur homozygote.

La mutation c.252-3C>G altère un site d'épissage du troisième exon (codant pour le domaine LIM2 de la protéine) et mène à deux transcrits codant pour des protéines LHX3 délétées de leur domaine LIM2 et de leur homéodomaine. Ces protéines constituées uniquement du domaine LIM1 ressemblent à la protéine LMO (*Nuclear Lim Only*) connue pour son rôle de régulateur transcriptionnel en présentant une affinité élevée pour des co-activateurs de LHX3, les détournant de leur cible. De fait, les protéines LHX3 tronquées ont un effet dominant négatif sur la protéine normale pouvant expliquer le phénotype partiel observé chez certains apparentés hétérozygotes.

De nombreux gènes identifiés comme étant impliqués dans le développement pituitaire, non seulement suite à des invalidations géniques chez la souris mais aussi suite à des études de transcriptome (différentielle ou non [Brinkmeier et al., 2009; Ellestad et al., 2006; Ma et al., 2009; Tanaka et al., 2002]) ou de protéome [Moreno et al., 2005] restent à tester. Une étude de transcriptome différentiel réalisée chez la souris (e14,5-e12,5 et e14,5-e14,5 *Prop1^{df/df}*) a permis de mettre en évidence 157 gènes impliqués dans les voies Bmp, Fgf, Wnt, Shh, Notch qui sont des candidats potentiels pour la recherche de mutations impliquées dans les maladies de la

croissance. L'étude protéomique réalisée par Moreno et al. a permis d'observer des changements d'expression pour *Sfrp1*, *Tle2*, *Pitx2*, *Notch3* et *Dlk1*. D'autre part, la recherche de régions homozygotes, par puce SNP, dans des familles consanguines de déficit pituitaire pourra permettre d'identifier de nouveaux gènes. Une approche basée sur le séquençage de l'exome des patients pourra aussi être utilisée ; cette méthode consiste à séquencer l'ensemble des régions codantes du génome pour chaque individu malade.

Recherche de partenaires de *POU1F1* au locus *GH*

Deux mutations très particulières de *POU1F1* ont été identifiées et conduisent à un IGHD. Ces deux mutations, p.Pro76Leu et p.Thr75Asn, ont été retrouvées, au niveau du TAD, chez des patients présentant un déficit en GH sans déficit associé en PRL et TSH, ce qui a motivé l'étude de la régulation de l'expression du gène *GH* par *POU1F1*.

Le LCR, spécifique de l'homme et du locus *GH* (non retrouvé au niveau des promoteurs *PRL* et *TSH*), est impliqué dans une boucle rapprochant les sites de *POU1F1* à ce niveau aux sites du promoteur *GH* [Ho et al., 2008]. Il a également été montré que la conformation de *POU1F1* est différente en fonction de son site de liaison [Ho et al., 2004; Shewchuk et al., 1999; Ho et al., 2008]. Nous avons voulu tirer parti de l'identification de ces deux mutations conduisant à un IGHD pour décrypter le mécanisme de régulation de l'expression du gène *GH* en identifiant les co-facteurs spécifiques de *POU1F1* au niveau du LCR et du promoteur *GH* et dont l'interaction serait modifiée en présence des mutations.

La région LCR du gène *GH* a été analysée chez 300 patients présentant un IGHD ; aucune variation de séquence n'a été mise en évidence au niveau de cette région. La présence d'une variation à ce niveau chez ces patients aurait, d'une part, confirmé que le LCR est indispensable à l'expression optimale de la GH chez l'homme et d'autre part, aurait permis de générer un « outil » moléculaire supplémentaire permettant l'utilisation d'une séquence mutée retrouvée physiologiquement.

Le fait d'avoir rencontré des difficultés de production des protéines en bactéries *E. coli* (grande différence de rendements entre les protéines normale et mutées à même condition de culture), suggère que les protéines mutées prennent

une conformation tridimensionnelle différente par rapport à la protéine POU1F1 normale. Ces résultats seraient en accord avec notre hypothèse puisqu'un changement de conformation pourrait entraîner une différence de recrutement des partenaires au niveau des sites de liaison.

L'utilisation du BIAcore a permis, dans un premier temps, de mieux définir l'interaction de POU1F1 (normale et mutées) sur ses séquences cibles (LCR *GH* et promoteur *GH*). Dans un second temps, le couplage BIAcore/spectrométrie de masse ayant déjà permis l'identification de partenaires [Zhukov et al., 2004; Shiba et al., 2001], nous avons utilisé cette approche afin d'identifier les co-facteurs de POU1F1 au niveau de ses cibles au locus *GH* mais aussi pour expliquer le phénotype des patients.

L'étude de l'interaction ADN-protéine a permis de déterminer les constantes d'affinité des différentes protéines POU1F1 pour leurs cibles ADN. Ainsi, nous avons pu montrer que l'affinité de POU1F1 est plus importante pour le promoteur *GH* que pour le LCR et que les protéines p.Pro76Leu et p.Thr75Asn semblent avoir plus d'affinité pour le LCR que la protéine native. Des études ont déjà permis de déterminer des constantes d'affinité entre une protéine et sa séquence ADN de fixation. D'une manière générale, les constantes de dissociation sont comprises entre 1.10^{-6} et 1.10^{-9} M [Jiang et Marszalek, 2011; Nutiu et al., 2011; Stormo et Zhao, 2010], ce qui correspond à nos résultats obtenus par utilisation du BIAcore. Nous avons choisi de produire et purifier nos protéines d'intérêt dans une souche bactérienne *E. coli*, qui sont dépourvues des enzymes, présentes dans les cellules eucaryotes, qui effectuent les modifications post-traductionnelles. Ces modifications pourraient être obtenues en utilisant d'autres approches de production protéique : les baculovirus ou l'utilisation des cellules humaines ou pituitaires transfectées avec les différentes constructions de *POU1F1*. Des protéines ainsi purifiées pourrait conduire à des constantes cinétiques différentes, peut être plus représentatives des valeurs physiologiques. Même en absence de modifications post-traductionnelles, nos résultats permettent de comparer les protéines POU1F1 mutées à la protéine normale. De plus, les expériences ont été réalisées plusieurs fois et les résultats obtenus étaient similaires ce qui montre la reproductibilité et la fiabilité de cette approche.

Bien que des expériences de couplages BIAcore/spectrométrie de masse aient déjà été réalisées, le choix des tampons utilisés sur le BIAcore est délicat

puisque'ils doivent, d'une part, permettre les interactions ligand/analyte et d'autre part, être compatible avec l'identification des partenaires en spectrométrie de masse. Cela nécessite des mises au point spécifiques à chaque protéine.

Certains des problèmes rencontrés sont actuellement résolus notamment en ce qui concerne la composition du tampon utilisé sur le BIAcore lors de l'injection de la protéine POU1F1 et des extraits nucléaires à tester mais aussi pour le tampon permettant la récupération du complexe protéique en interaction avec l'ADN. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse, après élution des complexes protéiques sur le BIAcore, ont mis en évidence un très grand nombre de pics peptidiques de faible intensité. Ces peptides ont été recherchés dans des banques de données mais cela n'a pas permis l'identification des protéines présentes dans l'éluat. Ces résultats sont peut être dus à l'existence d'un grand nombre de partenaires présents en trop faible quantité. L'augmentation de la quantité de protéines récupérées pourrait permettre de pallier à ce problème. Des western blots réalisés sur les différents extraits nucléaires utilisés, ou à tester sur le BIAcore, ont révélé une faible expression de POU1F1 endogène et donc certainement de ses partenaires. Des transfections de POU1F1 normal ou mutées dans ces lignées cellulaires (MCF-7, GHFT1, PIT1/0, PIT1/PrI) permettraient d'augmenter la concentration des protéines d'intérêt afin de mieux les identifier par la suite en spectrométrie de masse. Il faudra peut être également améliorer la méthode de préparation des extraits nucléaires.

Actuellement, les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un MALDI-TOF mais l'utilisation d'un orbitrap, appareil de détection plus sensible (détection de 1 fmol de protéine contre 10 fmol pour le MALDI-TOF), conduirait peut être à l'identification des partenaires de POU1F1 à partir des extraits nucléaires actuellement utilisés.

En parallèle, il est possible d'utiliser d'autres approches telles que la réalisation de gel en deux dimensions qui permettrait, à partir d'extraits nucléaires de cellules préalablement transfectées avec POU1F1 normale mais aussi POU1F1 p.Pro76Leu et p.Thr75Asn, de faire migrer les complexes formés puis d'identifier chacun des partenaires du complexe POU1F1 par spectrométrie de masse. Certains co-facteurs de POU1F1 étant déjà connus (CBP/p300, Ets1, LSD1...), une autre approche pourrait être de tester l'interaction de ces partenaires par co-immunoprécipitation et de déterminer les effets des mutations sur ces interactions.

Des expériences sont actuellement en cours entre POU1F1 (normale et mutées) et ses partenaires, notamment ceux interagissant avec le TAD.

Bien que le site HSII du LCR ne soit pas suffisant pour activer la transcription de *GH*, il est cependant indispensable au fonctionnement de ce locus chez l'homme, une publication très récente rapporte l'existence de cinq sites de fixation à POU1F1 [Hunsaker et al., 2010]. Un séquençage de HSII (1,2 kb) pourrait permettre l'identification d'une variation de séquence qui pourrait contribuer à un phénotype IGHD observé chez les patients. Les expériences ultérieures devront tenir compte de cette nouvelle information, en incluant par exemple les séquences cibles sur les puces utilisées.

Cristallographie

La structure du TAD de POU1F1 n'étant pas connue, nous avons tenté d'en apprendre davantage sur ce domaine particulièrement intéressant puisqu'il est le siège des deux nouvelles mutations identifiées au laboratoire.

La cristallisation d'une protéine dépend de nombreux facteurs, notamment de la concentration en protéine purifiée. L'obtention de quantité raisonnable par les techniques développées de production et de purification, a permis d'initier des expériences de cristallographie de manière à tenter de déterminer la structure tridimensionnelle de ce domaine.

Malgré de nombreuses conditions de cristallisation effectuées (2112 conditions tous peptides confondus), aucun cristal protéique n'a pu être observé et analysé.

Plusieurs éléments peuvent expliquer pourquoi ce domaine n'a pas pu être cristallisé jusqu'à présent. Premièrement, une analyse par spectrométrie de masse réalisée sur POU1F1₁₋₁₁₀ normal révèle une masse moléculaire de 12646 Da avec la présence de 4 autres pics supplémentaires (12687, 12723, 12765 et 12799 Da) au lieu de 12636 Da théorique. Le spectromètre de masse utilisé lors de cette analyse était calibré pour mesurer au dalton près la masse de la protéine purifiée. Cette variation de masse moléculaire, de nature inconnue, est un signe d'hétérogénéité, souvent peu favorable à la cristallisation. Cette hétérogénéité peut parfois s'expliquer par la présence de modifications post-traductionnelles. Les seules modifications connues de POU1F1 sont des phosphorylations de la sérine 115 et de la thréonine

220 [Kapiloff et al., 1991] ; or POU1F1₁₋₁₁₀ ne contient aucun de ces résidus et étant produite en *E. coli*, ces modifications post-traductionnelles ne sont donc pas présentes.

Deuxièmement, il est possible que le peptide synthétisé ne soit pas adapté à une étude de cristallographie. En effet, la structure secondaire prédictive indique qu'il existe une région non structurée aux environs des acides aminés 20 en N-terminal et 100 en C-terminal. Deux nouvelles constructions seront testées permettant d'obtenir les peptides POU1F1₁₋₁₀₀ et POU1F1₂₀₋₁₀₀. La taille plus petite de ces peptides pourrait favoriser la cristallisation.

Enfin, la solubilité des peptides peut être un facteur de non cristallisation. En effet, comme cela a bien été observé avec POU1F1₁₋₁₁₀ P76L, le peptide est peu soluble ce qui entraîne une perte importante de ce peptide au fur et à mesure des étapes de purification. Or, la forte concentration des protéines est un élément clé indispensable à la formation des cristaux. Des tests de solubilité de chacun de ces peptides permettraient d'optimiser le rendement final et par conséquent d'augmenter les chances de cristallisation.

CONCLUSION GENERALE

Depuis l'identification des mutations POU1F1 p.Pro76Leu et p.Thr75Asn, en absence de mutations sur des gènes associés aux IGHD, les ADN de patients IGHD sont systématiquement analysés non seulement pour la recherche de mutations au niveau des trois premiers exons de POU1F1 mais également au niveau de la région LCR du locus *GH*. De plus, les études de *SIX6* et *LHX2* ont permis la mise en place de protocoles permettant la recherche de mutations de ces gènes chez des individus présentant un phénotype proche de celui observé chez les souris *Six6*^{-/-} et *Lhx2*^{-/-}. L'identification de mutations pourra permettre d'impliquer ces gènes dans les maladies de la croissance et de les analyser dans un but de diagnostic.

L'approche BIAcore couplée à la spectrométrie de masse pour laquelle nous avons opté lors de cette étude, est une méthode d'identification de partenaires très prometteuse mais reste encore peu utilisée à ce jour [Lopez et al., 2003]. Bien que de nombreuses mises au point aient été nécessaires tant au niveau des études ADN-protéines sur le BIAcore qu'au niveau de la caractérisation des tampons compatibles avec la spectrométrie de masse, cela nous a permis de développer au sein du laboratoire des techniques non maîtrisées jusqu'à présent (production de protéines purifiées) et d'identifier les étapes critiques à cette technique. Ces étapes résolues, la facilité d'utilisation du BIAcore, la faible quantité de matériel nécessaire et la reproductibilité des résultats en font une approche attractive pour l'identification de nouveaux partenaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acampora, D, Mazan, S, Lallemand, Y, Avantaggiato, V, Maury, M, Simeone, A, Brulet, P. 1995. Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121: 3279 -3290.
- Ahmad, ME, Dada, R, Dada, T, Kucheria, K. 2003. 14q(22) deletion in a familial case of anophthalmia with polydactyly. *American Journal of Medical Genetics Part A* 120A: 117-122.
- Aijaz, S, Clark, BJ, Williamson, K, van Heyningen, V, Morrison, D, FitzPatrick, D, Collin, R, Ragge, N, Christoforou, A, Brown, A, Hanson, I. 2004. Absence of *SIX6* Mutations in Microphthalmia, Anophthalmia, and Coloboma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45: 3871 -3876.
- Alatzoglou, KS, Kelberman, D, Cowell, CT, Palmer, R, Arnhold, IJP, Melo, ME, Schnabel, D, Grueters, A, Dattani, MT. 2011. Increased Transactivation Associated with *SOX3* Polyalanine Tract Deletion in a Patient with Hypopituitarism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96: E685 - E690.
- Alatzoglou, KS, Turton, JP, Kelberman, D, Clayton, PE, Mehta, A, Buchanan, C, Aylwin, S, Crowne, EC, Christesen, HT, Hertel, NT, Trainer, PJ, Savage, MO, Raza, J, Banerjee, K, Sinha, SK, Ten, S, Mushtaq, T, Brauner, R, Cheetham, TD, Hindmarsh, PC, Mullis, PE, Dattani, MT. 2009. Expanding the Spectrum of Mutations in *GH1* and *GHRHR*: Genetic Screening in a Large Cohort of Patients with Congenital Isolated Growth Hormone Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94: 3191 -3199.
- Amselem, S, Duquesnoy, P, Attree, O, Novelli, G, Bousnina, S, Postel-Vinay, MC, Goossens, M. 1989. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 321: 989-995.
- Andoniadou, CL, Signore, M, Sajedi, E, Gaston-Massuet, C, Kelberman, D, Burns, AJ, Itasaki, N, Dattani, M, Martinez-Barbera, JP. 2007. Lack of the murine homeobox gene *Hesx1* leads to a posterior transformation of the anterior forebrain. *Development* 134: 1499-1508.
- Augustijn, KD, Duval, DL, Wechselberger, R, Kaptein, R, Gutierrez-Hartmann, A, van der Vliet, PC. 2002. Structural characterization of the *PIT-1/ETS-1* interaction: *PIT-1* phosphorylation regulates *PIT-1/ETS-1* binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12657-12662.
- Bach, I, Rhodes, SJ, Pearse, RV, Heinzl, T, Gloss, B, Scully, KM, Sawchenko, PE, Rosenfeld, MG. 1995. *P-Lim*, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with *Pit-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2720-2724.
- Bakrania, P, Efthymiou, M, Klein, JC, Salt, A, Bunyan, DJ, Wyatt, A, Ponting, CP, Martin, A, Williams, S, Lindley, V, Gilmore, J, Restori, M, Robson, AG, Neveu, MM, Holder, GE, Collin, JRO, Robinson, DO, Farndon, P, Johansen-Berg, H, Gerrelli, D, Ragge, NK. 2008. Mutations in *BMP4* Cause Eye, Brain, and Digit

- Developmental Anomalies: Overlap between the BMP4 and Hedgehog Signaling Pathways. *Am J Hum Genet* 82: 304-319.
- Beales, PL, Badano, JL, Ross, AJ, Ansley, SJ, Hoskins, BE, Kirsten, B, Mein, CA, Froguel, P, Scambler, PJ, Lewis, RA, Lupski, JR, Katsanis, N. 2003. Genetic Interaction of BBS1 Mutations with Alleles at Other BBS Loci Can Result in Non-Mendelian Bardet-Biedl Syndrome. *Am J Hum Genet* 72: 1187-1199.
- Bennani-Baïti, IM, Asa, SL, Song, D, Iratni, R, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 1998. DNase I-hypersensitive sites I and II of the human growth hormone locus control region are a major developmental activator of somatotrope gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10655-10660.
- Bennett, CP, Betts, DR, Seller, MJ. 1991. Deletion 14q (q22q23) associated with anophthalmia, absent pituitary, and other abnormalities. *J Med Genet* 28: 280-281.
- Bernier, G, Panitz, F, Zhou, X, Hollemann, T, Gruss, P, Pieler, T. 2000. Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos. *Mechanisms of Development* 93: 59-69.
- Bhangoo, APS, Hunter, CS, Savage, JJ, Anhalt, H, Pavlakis, S, Walvoord, EC, Ten, S, Rhodes, SJ. 2006. A Novel LHX3 Mutation Presenting as Combined Pituitary Hormonal Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 747-753.
- Bishai, WR, Rappuoli, R, Murphy, JR. 1987. High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169: 5140-5151.
- Bodner, M, Karin, M. 1987. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50: 267-275.
- Bonfig, W, Krude, H, Schmidt, H. 2011. A novel mutation of LHX3 is associated with combined pituitary hormone deficiency including ACTH deficiency, sensorineural hearing loss, and short neck—a case report and review of the literature. *European Journal of Pediatrics* 170: 1017-1021.
- Böttner, A, Keller, E, Kratzsch, J, Stobbe, H, Weigel, JFW, Keller, A, Hirsch, W, Kiess, W, Blum, WF, Pfäffle, RW. 2004. PROP1 Mutations Cause Progressive Deterioration of Anterior Pituitary Function including Adrenal Insufficiency: A Longitudinal Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 5256 -5265.
- Bradford, AP, Brodsky, KS, Diamond, SE, Kuhn, LC, Liu, Y, Gutierrez-Hartmann, A. 2000. The Pit-1 Homeodomain and β -Domain Interact with Ets-1 and Modulate Synergistic Activation of the Rat Prolactin Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 275: 3100 -3106.
- Brinkmeier, ML, Davis, SW, Carninci, P, MacDonald, JW, Kawai, J, Ghosh, D, Hayashizaki, Y, Lyons, RH, Camper, SA. 2009. Discovery of transcriptional

- regulators and signaling pathways in the developing pituitary gland by bioinformatic and genomic approaches. *Genomics* 93: 449-460.
- Brown, MR, Parks, JS, Adess, ME, Rich, BH, Rosenthal, IM, Voss, TC, VanderHeyden, TC, Hurley, DL. 1998. Central hypothyroidism reveals compound heterozygous mutations in the Pit-1 gene. *Horm. Res* 49: 98-102.
- Burgess, RR. 2009. Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. Dans: *Guide to Protein Purification*, 2nd Edition. Academic Press, p 259-282.
- Castillo, AI, Jimenez-Lara, AM, Tolon, RM, Aranda, A. 1999. Synergistic Activation of the Prolactin Promoter by Vitamin D Receptor and GHF-1: Role of the Coactivators, CREB-Binding Protein and Steroid Hormone Receptor Coactivator-1 (SRC-1). *Molecular Endocrinology* 13: 1141 -1154.
- Castinetti, F, Saveanu, A, Reynaud, R, Quentien, MH, Buffin, A, Brauner, R, Kaffel, N, Albarel, F, Guedj, AM, El Kholy, M, Amin, M, Enjalbert, A, Barlier, A, Brue, T. 2008. A novel dysfunctional LHX4 mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 93: 2790-2799.
- Catala, M, Trouillas, J. 2007. Embryologie de l'hypophyse humaine. *EM Endocrinologie-Nutrition*: [10-017-A-10].
- Chang, W, Zhou, W, Theill, LE, Baxter, JD, Schaufele, F. 1996. An Activation Function in Pit-1 Required Selectively for Synergistic Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 271: 17733 -17738.
- Charles, MA, Suh, H, Hjalt, TA, Drouin, J, Camper, SA, Gage, PJ. 2005. PITX Genes Are Required for Cell Survival and Lhx3 Activation. *Molecular Endocrinology* 19: 1893 -1903.
- Chen, R, Ingraham, HA, Treacy, MN, Albert, VR, Wilson, L, Rosenfeld, MG. 1990. Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. *Nature* 346: 583-586.
- Cogan, JD, Phillips, JA, 3rd. 1998. Growth disorders caused by genetic defects in the growth hormone pathway. *Adv Pediatr* 45: 337-361.
- Cohen, LE, Zanger, K, Brue, T, Wondisford, FE, Radovick, S. 1999. Defective Retinoic Acid Regulation of the Pit-1 Gene Enhancer: A Novel Mechanism of Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Molecular Endocrinology* 13: 476 -484.
- Cohen, RN, Brue, T, Naik, K, Houlihan, CA, Wondisford, FE, Radovick, S. 2006. The Role of CBP/p300 Interactions and Pit-1 Dimerization in the Pathophysiological Mechanism of Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91: 239 -247.
- Cooke, NE, Ray, J, Emery, JG, Liebhaber, SA. 1988. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression

- of novel growth hormone proteins. *Journal of Biological Chemistry* 263: 9001 - 9006.
- Dahl, L, Richter, K, Häggglund, A-C, Carlsson, L. 2008. Lhx2 Expression Promotes Self-Renewal of a Distinct Multipotential Hematopoietic Progenitor Cell in Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies. *PLoS ONE* 3.
- Dasen, JS, Barbera, J-PM, Herman, TS, Connell, SO, Olson, L, Ju, B, Tollkuhn, J, Baek, SH, Rose, DW, Rosenfeld, MG. 2001. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev* 15: 3193-3207.
- Dasen, JS, Rosenfeld, MG. 1999. Combinatorial codes in signaling and synergy: lessons from pituitary development. *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 566-574.
- Dateki, S, Fukami, M, Uematsu, A, Kaji, M, Iso, M, Ono, M, Mizota, M, Yokoya, S, Motomura, K, Kinoshita, E, Moriuchi, H, Ogata, T. 2010. Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with LHX4 Deletion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95: 4043 -4047.
- Dattani, MT, Martinez-Barbera, JP, Thomas, PQ, Brickman, JM, Gupta, R, Mårtensson, IL, Toresson, H, Fox, M, Wales, JK, Hindmarsh, PC, Krauss, S, Beddington, RS, Robinson, IC. 1998. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat. Genet* 19: 125-133.
- Dattani, MT, Robinson, IC. 2002. HESX1 and Septo-Optic Dysplasia. *Rev Endocr Metab Disord* 3: 289-300.
- Davis, SW, Camper, SA. 2007. Noggin Regulates Bmp4 Activity During Pituitary Induction. *Dev Biol* 305: 145-160.
- Demarco, IA, Voss, TC, Booker, CF, Day, RN. 2006. Dynamic Interactions between Pit-1 and C/EBP in the Pituitary Cell Nucleus. *Molecular and Cellular Biology* 26: 8087-8098.
- Desmaison, A, Vigouroux, A, Rieubland, C, Peres, C, Calvas, P, Chassaing, N. 2010. Mutations in the LHX2 gene are not a frequent cause of micro/anophthalmia. *Mol. Vis* 16: 2847-2849.
- Diazok, D, Romero, C, Zunich, J, Marshall, I, Radovick, S. 2008. A Novel Dominant Negative Mutation of OTX2 Associated with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4351-4359.
- DiMattia, GE, Rhodes, SJ, Krones, A, Carrière, C, O'Connell, S, Kalla, K, Arias, C, Sawchenko, P, Rosenfeld, MG. 1997. The PIT-1 Gene Is Regulated by Distinct Early and Late Pituitary-Specific Enhancers. *Developmental Biology* 182: 180-190.

- Duquesnoy, P, Roy, A, Dastot, F, Ghali, I, Teinturier, C, Netchine, I, Cacheux, V, Hafez, M, Salah, N, Chaussain, J-L, Goossens, M, Bougnères, P, Amselem, S. 1998. Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure: Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. *FEBS Letters* 437: 216-220.
- Duval, DL, Jean, A, Gutierrez-Hartmann, A. 2003. Ras Signaling and Transcriptional Synergy at a Flexible Ets-1/Pit-1 Composite DNA Element Is Defined by the Assembly of Selective Activation Domains. *Journal of Biological Chemistry* 278: 39684 -39696.
- Duval, DL, Jonsen, MD, Diamond, SE, Murapa, P, Jean, A, Gutierrez-Hartmann, A. 2007. Differential Utilization of Transcription Activation Subdomains by Distinct Coactivators Regulates Pit-1 Basal and Ras Responsiveness. *Molecular Endocrinology* 21: 172 -185.
- Elefant, F, Su, Y, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2000. Patterns of histone acetylation suggest dual pathways for gene activation by a bifunctional locus control region. *EMBO J* 19: 6814-6822.
- Ellestad, LE, Carre, W, Muchow, M, Jenkins, SA, Wang, X, Cogburn, LA, Porter, TE. 2006. Gene expression profiling during cellular differentiation in the embryonic pituitary gland using cDNA microarrays. *Physiological Genomics* 25: 414 -425.
- Elliott, J, Maltby, EL, Reynolds, B. 1993. A case of deletion 14(q22.1-->q22.3) associated with anophthalmia and pituitary abnormalities. *J Med Genet* 30: 251-252.
- Ellsworth, BS, Butts, DL, Camper, SA. 2008. Mechanisms Underlying Pituitary Hypoplasia and Failed Cell Specification in Lhx3 Deficient Mice. *Dev Biol* 313: 118-129.
- Ericson, J, Norlin, S, Jessell, TM, Edlund, T. 1998. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125: 1005 -1015.
- Fauquier, T, Rizzoti, K, Dattani, M, Lovell-Badge, R, Robinson, ICAF. 2008. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2907-2912.
- Ferry, AL, Locasto, DM, Meszaros, LB, Bailey, JC, Jonsen, MD, Brodsky, K, Hoon, CJ, Gutierrez-Hartmann, A, Diamond, SE. 2005. Pit-1 β reduces transcription and CREB-binding protein recruitment in a DNA context-dependent manner. *Journal of Endocrinology* 185: 173 -185.
- Fofanova, OV, Takamura, N, Kinoshita, E, Yoshimoto, M, Tsuji, Y, Peterkova, VA, Evgrafov, OV, Dedov, II, Goncharov, NP, Yamashita, S. 1998. Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. *American Journal of Medical Genetics* 77: 360-365.
- França, MM, Jorge, AAL, Alatzoglou, KS, Carvalho, LRS, Mendonça, BB, Audi, L, Carrascosa, A, Dattani, MT, Arnhold, IJP. 2011. Absence of GH-Releasing

Hormone (GHRH) Mutations in Selected Patients with Isolated GH Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96: E1457 -E1460.

- França, MM, Jorge, AAL, Carvalho, LRS, Costalonga, EF, Vasques, GA, Leite, CC, Mendonça, BB, Arnhold, IJP. 2010. Novel Heterozygous Nonsense GLI2 Mutations in Patients with Hypopituitarism and Ectopic Posterior Pituitary Lobe without Holoprosencephaly. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95: E384 -E391.
- Freyd, G, Kim, SK, Horvitz, HR. 1990. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344: 876-879.
- Gage, PJ, Lossie, AC, Scarlett, LM, Lloyd, RV, Camper, SA. 1995. Ames dwarf mice exhibit somatotrope commitment but lack growth hormone-releasing factor response. *Endocrinology* 136: 1161 -1167.
- Gage, PJ, Roller, ML, Saunders, TL, Scarlett, LM, Camper, SA. 1996. Anterior pituitary cells defective in the cell-autonomous factor, *df*, undergo cell lineage specification but not expansion. *Development* 122: 151 -160.
- Gage, PJ, Suh, H. 1999. The *bicoid* -related *Pitx* gene family in development. *Mammalian Genome* 10: 197-200.
- Gallardo, ME, Rodríguez de Córdoba, S, Schneider, AS, Dwyer, MA, Ayuso, C, Bovolenta, P. 2004. Analysis of the developmental *SIX6* homeobox gene in patients with anophthalmia/microphthalmia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 129A: 92-94.
- García, A, Alvarez, CV, Smith, RG, Diéguez, C. 2001. Regulation of PIT-1 Expression By Ghrelin and GHRP-6 Through the GH Secretagogue Receptor. *Molecular Endocrinology* 15: 1484 -1495.
- Gat-Yablonski, G, Klar, A, Hirsch, D, Eliakim, A, Lazar, L, Hurvitz, H, Phillip, M. 2005. Three novel mutations in *POU1F1* in Israeli patients with combined pituitary hormone deficiency. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 18: 385-393.
- Gerber, M, Shilatifard, A. 2003. Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II and Histone Methylation. *Journal of Biological Chemistry* 278: 26303 -26306.
- Gordon, DF, Lewis, SR, Haugen, BR, James, RA, McDermott, MT, Wood, WM, Ridgway, EC. 1997. Pit-1 and GATA-2 Interact and Functionally Cooperate to Activate the Thyrotropin β -Subunit Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 272: 24339 -24347.
- Gordon, DF, Woodmansee, WW, Black, JN, Dowding, JM, Bendrick-Pearl, J, Wood, WM, Ridgway, EC. 2002. Domains of Pit-1 required for transcriptional synergy with GATA-2 on the *TSH β* gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 196: 53-66.

- Hashimoto, Y, Cisternino, M, Cohen, LE. 2003. A Novel Nonsense Mutation in the Pit-1 Gene: Evidence for a Gene Dosage Effect. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1241-1247.
- Hayashi, S, Okamoto, N, Makita, Y, Hata, A, Imoto, I, Inazawa, J. 2008. Heterozygous deletion at 14q22.1–q22.3 including the BMP4 gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A: 2905-2910.
- Henderson, RH, Williamson, KA, Kennedy, JS, Webster, AR, Holder, GE, Robson, AG, FitzPatrick, DR, van Heyningen, V, Moore, AT. 2009. A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol Vis* 15: 2442-2447.
- Hendriks-Stegeman, BI, Augustijn, KD, Bakker, B, Holthuisen, P, van der Vliet, PC, Jansen, M. 2001. Combined Pituitary Hormone Deficiency Caused by Compound Heterozygosity for Two Novel Mutations in the POU Domain of the PIT1/POU1F1 Gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1545-1550.
- Hermesz, E, Mackem, S, Mahon, KA. 1996. Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122: 41 - 52.
- Hirota, J, Mombaerts, P. 2004. The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8751 - 8755.
- Hirt, H, Kimelman, J, Birnbaum, MJ, Chen, EY, Seeburg, PH, Eberhardt, NL, Barta, A. 1987. The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. *DNA* 6: 59-70.
- Ho, Y, Elefant, F, Cooke, N, Liebhaber, S. 2002. A Defined Locus Control Region Determinant Links Chromatin Domain Acetylation with Long-Range Gene Activation. *Molecular Cell* 9: 291-302.
- Ho, Y, Elefant, F, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2006. Locus Control Region Transcription Plays an Active Role in Long-Range Gene Activation. *Molecular Cell* 23: 365-375.
- Ho, Y, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2004. Activation of the human GH gene cluster: roles for targeted chromatin modification. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 15: 40-45.
- Ho, Y, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2011. The Role of the hGH Locus Control Region in Somatotrope Restriction of hGH-N Gene Expression. *Molecular Endocrinology* 25: 877 -884.

- Ho, Y, Tadevosyan, A, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2008. The juxtaposition of a promoter with a locus control region transcriptional domain activates gene expression. *EMBO Rep* 9: 891-898.
- Hobert, O, Westphal, H. 2000. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics* 16: 75-83.
- Holloway, JM, Szeto, DP, Scully, KM, Glass, CK, Rosenfeld, MG. 1995. Pit-1 binding to specific DNA sites as a monomer or dimer determines gene-specific use of a tyrosine-dependent synergy domain. *Genes & Development* 9: 1992 -2006.
- Holt, R. 2002. Fetal programming of the growth hormone–insulin-like growth factor axis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13: 392-397.
- Huelsken, J, Birchmeier, W. 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 11: 547-553.
- Hui, C. 1994. Expression of Three Mouse Homologs of the *Drosophila* Segment Polarity Gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in Ectoderm- and Mesoderm-Derived Tissues Suggests Multiple Roles during Postimplantation Development. *Developmental Biology* 162: 402-413.
- Hume, CR, Bratt, DL, Oesterle, EC. 2007. Expression of *LHX3* and *SOX2* during Mouse Inner Ear Development. *Gene Expr Patterns* 7: 798-807.
- Hunsaker, TL, Jefferson, HS, Morrison, JK, Franklin, AJ, Shewchuk, BM. 2010. *POU1F1*-Mediated Activation of *hGH-N* by Deoxyribonuclease I Hypersensitive Site II of the Human Growth Hormone Locus Control Region. *Journal of Molecular Biology*.
- Idrees, F, Bloch-Zupan, A, Free, SL, Vaideanu, D, Thompson, PJ, Ashley, P, Brice, G, Rutland, P, Bitner-Glindzicz, M, Khaw, PT, Fraser, S, Sisodiya, SM, Sowden, JC. 2006. A novel homeobox mutation in the *PITX2* gene in a family with Axenfeld-Rieger syndrome associated with brain, ocular, and dental phenotypes. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 141B: 184-191.
- Iguchi, G, Okimura, Y, Takahashi, T, Mizuno, I, Fumoto, M, Takahashi, Y, Kaji, H, Abe, H, Chihara, K. 1999. Cloning and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Growth Hormone-releasing Hormone Receptor Gene. *Journal of Biological Chemistry* 274: 12108 -12114.
- Ingraham, HA, Chen, R, Mangalam, HJ, Elsholtz, HP, Flynn, SE, Lin, CR, Simmons, DM, Swanson, L, Rosenfeld, MG. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55: 519-529.
- Inoue, H, Kangawa, N, Kinouchi, A, Sakamoto, Y, Kimura, C, Horikawa, R, Shigematsu, Y, Itakura, M, Ogata, T, Fujieda, K, on behalf of the Japan Growth Genome Consortium. 2011a. Identification and Functional Analysis of Novel Human Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR) Gene Mutations in Japanese Subjects with Short Stature. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96: E373 -E378.

- Inoue, H, Mukai, T, Sakamoto, Y, Kimura, C, Kangawa, N, Itakura, M, Ogata, T, Ito, Y, Fujieda, K. 2011b. Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*.
- Irie, Y, Tatsumi, K-I, Ogawa, M, Kamijo, T, Preeyasombat, C, Suprasongsin, C, Amino, N. 1995. A Novel E250X Mutation of the PIT1 Gene in a Patient with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Endocr J* 42: 351-354.
- Jacobson, EM, Li, P, Leon-del-Rio, A, Rosenfeld, MG, Aggarwal, AK. 1997. Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes & Development* 11: 198-212.
- Jancarik, J, Pufan, R, Hong, C, Kim, SH, Kim, R. 2004. Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 60: 1670-1673.
- Jean, D, Bernier, G, Gruss, P. 1999. Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech. Dev* 84: 31-40.
- Jiang, Y, Marszalek, PE. 2011. Atomic force microscopy captures MutS tetramers initiating DNA mismatch repair. *EMBO J* 30: 2881-2893.
- Jin, Y, Lu, SY, Fresnoza, A, Detillieux, KA, Duckworth, ML, Cattini, PA. 2009. Differential Placental Hormone Gene Expression during Pregnancy in a Transgenic Mouse Containing the Human Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin Locus. *Placenta* 30: 226-235.
- Jin, Y, Surabhi, RM, Fresnoza, A, Lytras, A, Cattini, PA. 1999. A Role for A/T-Rich Sequences and Pit-1/GHF-1 in a Distal Enhancer Located in the Human Growth Hormone Locus Control Region with Preferential Pituitary Activity in Culture and Transgenic Mice. *Molecular Endocrinology* 13: 1249 -1266.
- Jones, BK, Monks, BR, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 1995. The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region. *Mol Cell Biol* 15: 7010-7021.
- Jonsen, MD, Duval, DL, Gutierrez-Hartmann, A. 2009. The 26-Amino Acid β -Motif of the Pit-1 β Transcription Factor Is a Dominant and Independent Repressor Domain. *Mol Endocrinol* 23: 1371-1384.
- Kapiloff, MS, Farkash, Y, Wegner, M, Rosenfeld, MG. 1991. Variable effects of phosphorylation of Pit-1 dictated by the DNA response elements. *Science* 253: 786-789.
- Karlsson, O, Thor, S, Norberg, T, Ohlsson, H, Edlund, T. 1990. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo-and a Cys-His domain. *Nature* 344: 879-882.

- Katsanis, N. 2004. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Human Molecular Genetics* 13: 65R-71.
- Kawakami, K, Sato, S, Ozaki, H, Ikeda, K. 2000. Six family genes—structure and function as transcription factors and their roles in development. *BioEssays* 22: 616-626.
- Kelberman, D. 2006. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation*.
- Kelberman, D, de Castro, SCP, Huang, S, Crolla, JA, Palmer, R, Gregory, JW, Taylor, D, Cavallo, L, Faienza, MF, Fischetto, R, Achermann, JC, Martinez-Barbera, JP, Rizzoti, K, Lovell-Badge, R, Robinson, ICAF, Gerrelli, D, Dattani, MT. 2008. SOX2 Plays a Critical Role in the Pituitary, Forebrain, and Eye during Human Embryonic Development. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93: 1865 -1873.
- Kelberman, D, Rizzoti, K, Lovell-Badge, R, Robinson, I, Dattani, MT. 2009. Genetic Regulation of Pituitary Gland Development in Human and Mouse. *Endocr Rev* 30: 790-829.
- Kim, KK, Song, SB, Kang, KI, Rhee, M, Kim, KE. 2007. Activation of the Thyroid-Stimulating Hormone {beta}-Subunit Gene by LIM Homeodomain Transcription Factor Lhx2. *Endocrinology* 148: 3468-3476.
- Kimura, AP, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2004. Epigenetic Modifications at the Human Growth Hormone Locus Predict Distinct Roles for Histone Acetylation and Methylation in Placental Gene Activation. *Molecular Endocrinology* 18: 1018 - 1032.
- Kimura, AP, Sizova, D, Handwerger, S, Cooke, NE, Liebhaber, SA. 2007. Epigenetic Activation of the Human Growth Hormone Gene Cluster during Placental Cytotrophoblast Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6555-6568.
- Kioussi, C, Carrière, C, Rosenfeld, MG. 1999. A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mech. Dev* 81: 23-35.
- Kishimoto, M, Okimura, Y, Yagita, K, Iguchi, G, Fumoto, M, Iida, K, Kaji, H, Okamura, H, Chihara, K. 2002. Novel Function of the Transactivation Domain of a Pituitary-specific Transcription Factor, Pit-1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 45141 -45148.
- Kitajima, K, Minehata, K-ichi, Sakimura, K, Nakano, T, Hara, T. 2011. In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2. *Blood* 117: 3748 -3758.
- Kitamura, K, Miura, H, Miyagawa-Tomita, S, Yanazawa, M, Katoh-Fukui, Y, Suzuki, R, Ohuchi, H, Suehiro, A, Motegi, Y, Nakahara, Y, Kondo, S, Yokoyama, M. 1999. Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periorcular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development* 126: 5749 -5758.

- Korbonits, M, Kojima, M, Kangawa, K, Grossman, AB. 2001. Presence of Ghrelin in Normal and Adenomatous Human Pituitary. *Endocrine* 14: 101-104.
- Kristrom, B, Zdunek, A-M, Rydh, A, Jonsson, H, Sehlin, P, Escher, SA. 2009. A Novel Mutation in the LIM Homeobox 3 Gene Is Responsible for Combined Pituitary Hormone Deficiency, Hearing Impairment, and Vertebral Malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1154-1161.
- Kurokawa, D, Kiyonari, H, Nakayama, R, Kimura-Yoshida, C, Matsuo, I, Aizawa, S. 2004. Regulation of Otx2 expression and its functions in mouse forebrain and midbrain. *Development* 131: 3319 -3331.
- Kwon, TK, Nagel, JE, Buchholz, MA, Nordin, AA. 1996. Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene* 180: 113-120.
- Lagerström-Fermér, M, Sundvall, M, Johnsen, E, Warne, GL, Forrest, SM, Zajac, JD, Rickards, A, Ravine, D, Landegren, U, Pettersson, U. 1997. X-linked recessive panhypopituitarism associated with a regional duplication in Xq25-q26. *Am J Hum Genet* 60: 910-916.
- Lamonerie, T, Tremblay, JJ, Lanctôt, C, Therrien, M, Gauthier, Y, Drouin, J. 1996. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes & Development* 10: 1284 -1295.
- Lanctot, C, Moreau, A, Chamberland, M, Tremblay, ML, Drouin, J. 1999. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* 126: 1805 -1810.
- Laumonnier, F, Ronce, N, Hamel, BCJ, Thomas, P, Lespinasse, J, Raynaud, M, Paringaux, C, van Bokhoven, H, Kalscheuer, V, Fryns, J-P, Chelly, J, Moraine, C, Briault, S. 2002. Transcription Factor SOX3 Is Involved in X-Linked Mental Retardation with Growth Hormone Deficiency. *Am J Hum Genet* 71: 1450-1455.
- Lefevre, C, Imagawa, M, Dana, S, Grindlay, J, Bodner, M, Karin, M. 1987. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J* 6: 971-981.
- Lemyre, E, Lemieux, N, Décarie, JC, Lambert, M. 1998. Del(14)(q22.1q23.2) in a patient with anophthalmia and pituitary hypoplasia. *American Journal of Medical Genetics* 77: 162-165.
- Lewis, UJ, Singh, RN, Tutwiler, GF, Sigel, MB, VanderLaan, EF, VanderLaan, WP. 1980. Human growth hormone: a complex of proteins. *Recent Prog. Horm. Res.* 36: 477-508.
- Li, S, Crenshaw, EB, Rawson, EJ, Simmons, DM, Swanson, LW, Rosenfeld, MG. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347: 528-533.
- Li, X, Oghi, KA, Zhang, J, Krones, A, Bush, KT, Glass, CK, Nigam, SK, Aggarwal, AK, Maas, R, Rose, DW, Rosenfeld, MG. 2003. Eya protein phosphatase

- activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426: 247-254.
- Li, X, Rosenfeld, MG. 2002. Tissue-Specific Regulation of Retinal and Pituitary Precursor Cell Proliferation. *Science*.
- Lin, C, Lin, S-C, Chang, C-P, Rosenfeld, MG. 1992. Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768.
- Lin, CR, Kioussi, C, O'Connell, S, Briata, P, Szeto, D, Liu, F, Izpisua-Belmonte, JC, Rosenfeld, MG. 1999. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401: 279-282.
- Lin, S-C, Lin, CR, Gukovsky, I, Lusi, AJ, Sawchenko, PE, Rosenfeld, MG. 1993. Molecular basis of the little mouse phenotype and Implications for cell type-specific growth. *Nature* 364: 208-213.
- Lipkin, SM, Näär, AM, Kalla, KA, Sack, RA, Rosenfeld, MG. 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes & Development* 7: 1674 - 1687.
- Lopez, F, Pichereaux, C, Burlet-Schiltz, O, Pradayrol, L, Monsarrat, B, Estève, J. 2003. Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules. *PROTEOMICS* 3: 402-412.
- Lopez-Rios, J, Gallardo, ME, Rodriguez de Cordoba, S, Bovolenta, P. 1999. Six9 (Optx2), a new member of the Six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development. *Mechanisms of Development* 83: 155-159.
- Ma, Y, Qi, X, Du, J, Song, S, Feng, D, Qi, J, Zhu, Z, Zhang, X, Xiao, H, Han, Z, Hao, X. 2009. Identification of candidate genes for human pituitary development by EST analysis. *BMC Genomics* 10: 109-109.
- Machinis, K, Amselem, S. 2005. Functional Relationship between LHX4 and POU1F1 in Light of the LHX4 Mutation Identified in Patients with Pituitary Defects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 5456 -5462.
- Machinis, K, Pantel, J, Netchine, I, Léger, J, Camand, OJA, Sobrier, M-L, Moal, FD-L, Duquesnoy, P, Abitbol, M, Czernichow, P, Amselem, S. 2001. Syndromic Short Stature in Patients with a Germline Mutation in the LIM Homeobox LHX4. *The American Journal of Human Genetics* 69: 961-968.
- Majka, J, Speck, C. 2007. Analysis of protein-DNA interactions using surface plasmon resonance. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 104: 13-36.
- Malvagia, S, Poggi, GM, Pasquini, E, Donati, MA, Pela, I, Morrone, A, Zammarchi, E. 2003. The de novo Q167K mutation in the POU1F1 gene leads to combined pituitary hormone deficiency in an Italian patient. *Pediatr. Res* 54: 635-640.

- Mangalam, HJ, Albert, VR, Ingraham, HA, Kapiloff, M, Wilson, L, Nelson, C, Elsholtz, H, Rosenfeld, MG. 1989. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes & Development* 3: 946 -958.
- Masuda, N, Watahiki, M, Tanaka, M, Yamakawa, M, Shimizu, K, Nagai, J, Nakashima, K. 1988. Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 949: 125-131.
- Masui, S, Nakatake, Y, Toyooka, Y, Shimosato, D, Yagi, R, Takahashi, K, Okochi, H, Okuda, A, Matoba, R, Sharov, AA, Ko, MSH, Niwa, H. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9: 625-635.
- McLennan, K, Jeske, Y, Cotterill, A, Cowley, D, Penfold, J, Jones, T, Howard, N, Thomsett, M, Choong, C. 2003. Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. *Clinical Endocrinology* 58: 785-794.
- Mellado, C, Poduri, A, Gleason, D, Elhosary, PC, Barry, BJ, Partlow, JN, Chang, BS, Shaw, GM, Barkovich, AJ, Walsh, CA. 2010. Candidate Gene Sequencing of LHX2, HESX1, and SOX2 in a Large Schizencephaly Cohort. *Am J Med Genet A* 152A: 2736-2742.
- Miller, WL, Eberhardt, NL. 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* 4: 97-130.
- Miyata, I, Vallette-Kasic, S, Saveanu, A, Takeuchi, M, Yoshikawa, H, Tajima, A, Tojo, K, Reynaud, R, Gueydan, M, Enjalbert, A, Tajima, N, Eto, Y, Brue, T. 2006. Identification and Functional Analysis of the Novel S179R POU1F1 Mutation Associated with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91: 4981 -4987.
- Mo, R, Freer, AM, Zinyk, DL, Crackower, MA, Michaud, J, Heng, HH, Chik, KW, Shi, XM, Tsui, LC, Cheng, SH, Joyner, AL, Hui, C. 1997. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124: 113 -123.
- Moreno, CS, Evans, C-O, Zhan, X, Okor, M, Desiderio, DM, Oyesiku, NM. 2005. Novel Molecular Signaling and Classification of Human Clinically Nonfunctional Pituitary Adenomas Identified by Gene Expression Profiling and Proteomic Analyses. *Cancer Research* 65: 10214 -10222.
- Morris, AE, Kloss, B, McChesney, RE, Bancroft, C, Chasin, LA. 1992. An alternatively spliced Pit-1 isoform altered in its ability to trans-activate. *Nucleic Acids Res* 20: 1355-1361.
- Motoyama, J, Liu, J, Mo, R, Ding, Q, Post, M, Hui, C-chung. 1998. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 20: 54-57.

- Netchine, I, Sobrier, ML, Krude, H, Schnabel, D, Maghnie, M, Marcos, E, Duriez, B, Cacheux, V, Moers, A v, Goossens, M, Grüters, A, Amselem, S. 2000. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* 25: 182-186.
- Nolen, LD, Amor, D, Haywood, A, St. Heaps, L, Willcock, C, Mihelec, M, Tam, P, Billson, F, Grigg, J, Peters, G, Jamieson, RV. 2006. Deletion at 14q22□23 indicates a contiguous gene syndrome comprising anophthalmia, pituitary hypoplasia, and ear anomalies. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A: 1711-1718.
- Norlin, S, Nordström, U, Edlund, T. 2000. Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary. *Mechanisms of Development* 96: 175-182.
- Nutiu, R, Friedman, RC, Luo, S, Khrebtukova, I, Silva, D, Li, R, Zhang, L, Schroth, GP, Burge, CB. 2011. Direct measurement of DNA affinity landscapes on a high-throughput sequencing instrument. *Nat Biotech* 29: 659-664.
- Ohta, K, Nobukuni, Y, Mitsubuchi, H, Fujimoto, S, Matsuo, N, Inagaki, H, Endo, F, Matsuda, I. 1992. Mutations in the PIT-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189: 851-855.
- Olson, LE, Tollkuhn, J, Scafoglio, C, Krones, A, Zhang, J, Ohgi, KA, Wu, W, Taketo, MM, Kemler, R, Grosschedl, R, Rose, D, Li, X, Rosenfeld, MG. 2006. Homeodomain-Mediated β -Catenin-Dependent Switching Events Dictate Cell-Lineage Determination. *Cell* 125: 593-605.
- Palomino, T, Sánchez-pacheco, A, Peña, P, Aranda, A. 1998. A direct protein-protein interaction is involved in the cooperation between thyroid hormone and retinoic acid receptors and the transcription factor GHF-1. *The FASEB Journal* 12: 1201 -1209.
- Pantel, J, Legendre, M, Cabrol, S, Hilal, L, Hajaji, Y, Morisset, S, Nivot, S, Vie-Luton, M-P, Grouselle, D, de Kerdanet, M, Kadiri, A, Epelbaum, J, Le Bouc, Y, Amselem, S. 2006. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116: 760-768.
- Pantel, J, Legendre, M, Nivot, S, Morisset, S, Vie-Luton, M-P, le Bouc, Y, Epelbaum, J, Amselem, S. 2009. Recessive Isolated Growth Hormone Deficiency and Mutations in the Ghrelin Receptor. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94: 4334 -4341.
- Pellegrini-Bouiller, I, Belicar, P, Barlier, A, Gunz, G, Charvet, J, Jaquet, P, Brue, T, Vialettes, B, Enjalbert, A. 1996. A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2790-2796.
- Pernasetti, F, Milner, RDG, Al Ashwal, AAZ, de Zegher, F, Chavez, VM, Muller, M, Martial, JA. 1998. Pro239Ser: A Novel Recessive Mutation of the Pit-1 Gene in Seven Middle Eastern Children with Growth Hormone, Prolactin, and

- Thyrotropin Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83: 2079 -2083.
- Pfaeffle, RW, Hunter, CS, Savage, JJ, Duran-Prado, M, Mullen, RD, Neeb, ZP, Eiholzer, U, Hesse, V, Haddad, NG, Stobbe, HM, Blum, WF, Weigel, JFW, Rhodes, SJ. 2008. Three Novel Missense Mutations within the LHX4 Gene Are Associated with Variable Pituitary Hormone Deficiencies. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1062-1071.
- Pfaeffle, RW, Savage, JJ, Hunter, CS, Palme, C, Ahlmann, M, Kumar, P, Bellone, J, Schoenau, E, Korsch, E, Brämwig, JH, Stobbe, HM, Blum, WF, Rhodes, SJ. 2007. Four Novel Mutations of the LHX3 Gene Cause Combined Pituitary Hormone Deficiencies with or without Limited Neck Rotation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92: 1909 -1919.
- Pfäffle, R, Klammt, J. 2011. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25: 43-60.
- Pfäffle, RW, DiMattia, GE, Parks, JS, Brown, MR, Wit, JM, Jansen, M, Van der Nat, H, Van den Brande, JL, Rosenfeld, MG, Ingraham, HA. 1992. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science* 257: 1118-1121.
- Phadke, SR, Sharma, AK, Agarwal, SS. 1994. Anophthalmia with cleft palate and micrognathia: a new syndrome? *J Med Genet* 31: 960-961.
- Porter, FD, Drago, J, Xu, Y, Cheema, SS, Wassif, C, Huang, SP, Lee, E, Grinberg, A, Massalas, JS, Bodine, D, Alt, F, Westphal, H. 1997. Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* 124: 2935 -2944.
- Potok, MA, Cha, KB, Hunt, A, Brinkmeier, ML, Leitges, M, Kispert, A, Camper, SA. 2008. WNT signaling affects gene expression in the ventral diencephalon and pituitary gland growth. *Dev Dyn* 237: 1006-1020.
- Prince, KL, Walvoord, EC, Rhodes, SJ. 2011. The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease. *Nat Rev Endocrinol* 7: 727-737.
- Qi, Y, Ranish, JA, Zhu, X, Krones, A, Zhang, J, Aebersold, R, Rose, DW, Rosenfeld, MG, Carrière, C. 2008. Atbf1 is required for the Pit1 gene early activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2481 -2486.
- Radovick, S, Nations, M, Du, Y, Berg, LA, Weintraub, BD, Wondisford, FE. 1992. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* 257: 1115-1118.
- Raetzman, LT, Ward, R, Camper, SA. 2002. Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. *Development* 129: 4229 -4239.

- Rainbow, LA, Rees, SA, Shaikh, MG, Shaw, NJ, Cole, T, Barrett, TG, Kirk, JMW. 2005. Mutation analysis of POU¹, PROP¹ and HESX¹ show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. *Clinical Endocrinology* 62: 163-168.
- Rajab, A, Pearce, K, Hall, CM, Shaikh, G, Gerrelli, D, Grueters, A, Krude, H, Dattani, MT. 2008. Novel mutations in LHX3 are associated with hypopituitarism and sensorineural hearing loss. *Human Molecular Genetics* 17: 2150 -2159.
- Rappaport, R, Amselem, S. 2001. Hypothalamic-pituitary development: genetic and clinical aspects. Karger Publishers. 190 p.
- Reynaud, R, Castinetti, F, Galon-Faure, N, Albarel-Loy, F, Saveanu, A, Quentien, MH, Jullien, N, Khammar, A, Enjalbert, A, Barlier, A, Brue, T. 2011. Genetic aspects of growth hormone deficiency. *Arch Pediatr* 18: 696-706.
- Rhee, H, Polak, L, Fuchs, E. 2006. Lhx2 Maintains Stem Cell Character in Hair Follicles. *Science* 312: 1946-1949.
- Rhinn, M, Dierich, A, Le Meur, M, Ang, S. 1999. Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development* 126: 4295 -4304.
- Rhodes, SJ, Krones, A, Nelson, C, Rosenfeld, MG. 1996. Function of the conserved Pit-1 gene distal enhancer in progenitor and differentiated pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol* 124: 163-172.
- Rizzoti, K, Brunelli, S, Carmignac, D, Thomas, PQ, Robinson, IC, Lovell-Badge, R. 2004. SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet* 36: 247-255.
- Rizzoti, K, Lovell-Badge, R. 2007. SOX3 activity during pharyngeal segmentation is required for craniofacial morphogenesis. *Development* 134: 3437 -3448.
- Roberson, MS, Schoderbek, WE, Tremml, G, Maurer, RA. 1994. Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Biol* 14: 2985-2993.
- Roessler, E, Du, Y-Z, Mullor, JL, Casas, E, Allen, WP, Gillesen-Kaesbach, G, Roeder, ER, Ming, JE, Altaba, AR i, Muenke, M. 2003. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13424-13429.
- Ryan, AK, Rosenfeld, MG. 1997. POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes & Development* 11: 1207 -1225.
- Sajedi, E, Gaston-Massuet, C, Signore, M, Andoniadou, CL, Kelberman, D, Castro, S, Etchevers, HC, Gerrelli, D, Dattani, MT, Martinez-Barbera, JP. 2008. Analysis of mouse models carrying the I26T and R160C substitutions in the transcriptional repressor HESX1 as models for septo-optic dysplasia and hypopituitarism. *Dis Model Mech* 1: 241-254.

- Salemi, S, Besson, A, Eblé, A, Gallati, S, Pfäffle, RW, Mullis, PE. 2003. New N-terminal located mutation (Q4ter) within the POU1F1-gene (PIT-1) causes recessive combined pituitary hormone deficiency and variable phenotype. *Growth Hormone & IGF Research* 13: 264-268.
- Schaufele, F. 1996. CCAAT/Enhancer-binding Protein α Activation of the Rat Growth Hormone Promoter in Pituitary Progenitor GHFT1-5 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 271: 21484 -21489.
- Schaufele, F, West, BL, Baxter, JD. 1992. Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Molecular Endocrinology* 6: 656 -665.
- Scully, KM, Jacobson, EM, Jepsen, K, Lunyak, V, Viadiu, H, Carrière, C, Rose, DW, Hooshmand, F, Aggarwal, AK, Rosenfeld, MG. 2000. Allosteric Effects of Pit-1 DNA Sites on Long-Term Repression in Cell Type Specification. *Science* 290: 1127 -1131.
- Semina, EV, Reiter, R, Leysens, NJ, Alward, WLM, Small, KW, Datson, NA, Siegel-Bartelt, J, Bierke-Nelson, D, Bitoun, P, Zabel, BU, Carey, JC, Murray, JC. 1996. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 14: 392-399.
- Sharma, K, Sheng, HZ, Lettieri, K, Li, H, Karavanov, A, Potter, S, Westphal, H, Pfaff, SL. 1998. LIM Homeodomain Factors Lhx3 and Lhx4 Assign Subtype Identities for Motor Neurons. *Cell* 95: 817-828.
- Sheng, HZ, Moriyama, K, Yamashita, T, Li, H, Potter, SS, Mahon, KA, Westphal, H. 1997. Multistep Control of Pituitary Organogenesis. *Science* 278: 1809 -1812.
- Sheng, HZ, Westphal, H. 1999. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends in Genetics* 15: 236-240.
- Sheng, HZ, Zhadanov, AB, Mosinger, B, Jr, Fujii, T, Bertuzzi, S, Grinberg, A, Lee, EJ, Huang, SP, Mahon, KA, Westphal, H. 1996. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 272: 1004-1007.
- Shewchuk, BM, Asa, SL, Cooke, NE, Liebhaber, SA. 1999. Pit-1 Binding Sites at the Somatotrope-specific DNase I Hypersensitive Sites I, II of the Human Growth Hormone Locus Control Region Are Essential for in Vivo hGH-N Gene Activation. *Journal of Biological Chemistry* 274: 35725 -35733.
- Shewchuk, BM, Ho, Y, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2006. A Single Base Difference between Pit-1 Binding Sites at the hGH Promoter and Locus Control Region Specifies Distinct Pit-1 Conformations and Functions. *Mol Cell Biol* 26: 6535-6546.
- Shewchuk, BM, Liebhaber, SA, Cooke, NE. 2002. Specification of unique Pit-1 activity in the hGH locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11784-11789.

- Shiba, H, Takayama, S, Iwano, M, Shimosato, H, Funato, M, Nakagawa, T, Che, F-S, Suzuki, G, Watanabe, M, Hinata, K, Isogai, A. 2001. A Pollen Coat Protein, SP11/SCR, Determines the Pollen S-Specificity in the Self-Incompatibility of Brassica Species. *Plant Physiol* 125: 2095-2103.
- Showalter, AD, Smith, TPL, Bennett, GL, Sloop, KW, Whitsett, JA, Rhodes, SJ. 2002. Differential conservation of transcriptional domains of mammalian Prophet of Pit-1 proteins revealed by structural studies of the bovine gene and comparative functional analysis of the protein. *Gene* 291: 211-221.
- Showalter, AD, Yaden, BC, Chernoff, EAG, Rhodes, SJ. 2004. Cloning and analysis of axolotl ISL2 and LHX2 LIM-homeodomain transcription factors. *genesis* 38: 110-121.
- Sizova, D, Ho, Y, Cooke, NE, Liebhaber, SA. 2010. Research Resource: T-Antigen Transformation of Pituitary Cells Captures Three Novel Cell Lines in the Pit-1 Lineage. *Molecular Endocrinology* 24: 2232 -2240.
- Sloop, KW, Dwyer, CJ, Rhodes, SJ. 2001. An Isoform-specific Inhibitory Domain Regulates the LHX3 LIM Homeodomain Factor Holoprotein and the Production of a Functional Alternate Translation Form. *Journal of Biological Chemistry* 276: 36311 -36319.
- Snabboon, T, Plengpanich, W, Buranasupkajorn, P, Khwanjaipanich, R, Vasinanukorn, P, Suwanwalaikorn, S, Khovidhunkit, W, Shotelersuk, V. 2008. A novel germline mutation, IVS4+1G>A, of the POU1F1 gene underlying combined pituitary hormone deficiency. *Horm. Res* 69: 60-64.
- Sobrier, M, Netchine, I, Heinrichs, C, Thibaud, N, Vié-Luton, M, Van Vliet, G, Amselem, S. 2005. Alu-element insertion in the homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. *Human Mutation* 25: 503-503.
- Sobrier, M-L, Attié-Bitach, T, Netchine, I, Encha-Razavi, F, Vekemans, M, Amselem, S. 2004. Pathophysiology of syndromic combined pituitary hormone deficiency due to a LHX3 defect in light of LHX3 and LHX4 expression during early human development. *Gene Expression Patterns* 5: 279-284.
- Sobrier, M-L, Maghnie, M, Vie-Luton, M-P, Secco, A, di Iorgi, N, Lorini, R, Amselem, S. 2006. Novel HESX1 Mutations Associated with a Life-Threatening Neonatal Phenotype, Pituitary Aplasia, but Normally Located Posterior Pituitary and No Optic Nerve Abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4528-4536.
- Sornson, MW, Wu, W, Dasen, JS, Flynn, SE, Norman, DJ, O'Connell, SM, Gukovsky, I, Carriere, C, Ryan, AK, Miller, AP, Zuo, L, Gleiberman, AS, Andersen, B, Beamer, WG, Rosenfeld, MG. 1996. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384: 327-333.
- Stark, K, Vainio, S, Vassileva, G, McMahon, AP. 1994. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372: 679-683.

- Steinfelder, HJ, Hauser, P, Nakayama, Y, Radovick, S, McClaskey, JH, Taylor, T, Weintraub, BD, Wondisford, FE. 1991. Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHB expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3130-3134.
- Stormo, GD, Zhao, Y. 2010. Determining the specificity of protein–DNA interactions. *Nat Rev Genet* 11: 751-760.
- Sturm, RA, Herr, W. 1988. The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* 336: 601-604.
- Suh, H, Gage, PJ, Drouin, J, Camper, SA. 2002. Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129: 329 -337.
- Szeto, DP, Ryan, AK, O'Connell, SM, Rosenfeld, MG. 1996. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7706-7710.
- Tajima, T, Hattori, T, Nakajima, T, Okuhara, K, Tsubaki, J, Fujieda, K. 2007. A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocr. J* 54: 637-641.
- Takuma, N, Sheng, HZ, Furuta, Y, Ward, JM, Sharma, K, Hogan, BL, Pfaff, SL, Westphal, H, Kimura, S, Mahon, KA. 1998. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125: 4835 -4840.
- Tanaka, S, Tatsumi, K, Okubo, K, Itoh, K, Kawamoto, S, Matsubara, K, Amino, N. 2002. Expression profile of active genes in the human pituitary gland. *Journal of Molecular Endocrinology* 28: 33 -44.
- Tang, K, Bartke, A, Gardiner, CS, Wagner, TE, Yun, JS. 1993. Gonadotropin secretion, synthesis, and gene expression in human growth hormone transgenic mice and in Ames dwarf mice. *Endocrinology* 132: 2518 -2524.
- Tatsumi, K-ita, Miyai, K, Notomi, T, Kaibe, K, Amino, N, Mizuno, Y, Kohno, H. 1992. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat Genet* 1: 56-58.
- Tenenbaum-Rakover, Y, Sobrier, M, Amselem, S. 2011. A novel POU1F1 mutation (p.Thr168IlefsX7) associated with an early and severe form of combined pituitary hormone deficiency: functional analysis and follow-up from infancy to adulthood. *Clinical Endocrinology* 75: 214-219.
- Tétreault, N, Champagne, M-P, Bernier, G. 2009. The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Developmental Biology* 327: 541-550.

- Theill, LE, Hattori, K, Lazzaro, D, Castrillo, JL, Karin, M. 1992. Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. *EMBO J* 11: 2261-2269.
- Thomas, PQ, Johnson, BV, Rathjen, J, Rathjen, PD. 1995. Sequence, Genomic Organization, and Expression of the Novel Homeobox Gene *Hesx1*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 3869 -3875.
- Tolle, V, Bassant, M-H, Zizzari, P, Poindessous-Jazat, F, Tomasetto, C, Epelbaum, J, Bluet-Pajot, M-T. 2002. Ultradian Rhythmicity of Ghrelin Secretion in Relation with GH, Feeding Behavior, and Sleep-Wake Patterns in Rats. *Endocrinology* 143: 1353 -1361.
- Törnqvist, G, Sandberg, A, Hägglund, A-C, Carlsson, L. 2010. Cyclic Expression of *Lhx2* Regulates Hair Formation. *PLoS Genet* 6.
- Toy, J, Sundin, OH. 1999. Expression of the *Otx2* homeobox gene during mouse development. *Mechanisms of Development* 83: 183-186.
- Treier, M, Gleiberman, AS, O'Connell, SM, Szeto, DP, McMahon, JA, McMahon, AP, Rosenfeld, MG. 1998. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis *in vivo*. *Genes Dev* 12: 1691-1704.
- Treier, M, O'Connell, S, Gleiberman, A, Price, J, Szeto, DP, Burgess, R, Chuang, PT, McMahon, AP, Rosenfeld, MG. 2001. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 128: 377 -386.
- Tremblay, JJ, Goodyer, CG, Drouin, J. 2000. Transcriptional Properties of *Ptx1* and *Ptx2* Isoforms. *Neuroendocrinology* 71: 277-286.
- Tremblay, JJ, Lanctôt, C, Drouin, J. 1998. The pan-Pituitary Activator of Transcription, *Ptx1* (Pituitary Homeobox 1), Acts in Synergy with SF-1 and *Pit1* and Is an Upstream Regulator of the Lim-Homeodomain Gene *Lim3/Lhx3*. *Molecular Endocrinology* 12: 428 -441.
- Turton, JP, Strom, M, Langham, S, Dattani, MT, Le Tissier, P. 2011. Two novel mutations in the *POU1F1* gene generate null alleles through different mechanisms leading to Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Clinical Endocrinology*.
- Turton, JPG, Reynaud, R, Mehta, A, Torpiano, J, Saveanu, A, Woods, KS, Tiulpakov, A, Zdravkovic, V, Hamilton, J, Attard-Montalto, S, Parascandalo, R, Vella, C, Clayton, PE, Shalet, S, Barton, J, Brue, T, Dattani, MT. 2005. Novel Mutations within the *POU1F1* Gene Associated with Variable Combined Pituitary Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4762-4770.
- Vesper, AH, Raetzman, LT, Camper, SA. 2006. Role of Prophet of *Pit1* (*PROP1*) in Gonadotrope Differentiation and Puberty. *Endocrinology* 147: 1654 -1663.
- Voss, JW, Rosenfeld, MG. 1992. Anterior pituitary development: Short tales from dwarf mice. *Cell* 70: 527-530.

- Wajnrajch, MP, Chua, SC, Green, ED, Leibel, RL. 1994. Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at chromosome 7p15. *Mamm. Genome* 5: 595.
- Wajnrajch, MP, Gertner, JM, Harbison, MD, Chua, SC, Leibel, RL. 1996. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* 12: 88-90.
- Wandzioch, E, Kolterud, Å, Jacobsson, M, Friedman, SL, Carlsson, L. 2004. *Lhx2*^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16549-16554.
- Wang, H-J, Geller, F, Dempfle, A, Schäuble, N, Friedel, S, Lichtner, P, Fontenla-Horro, F, Wudy, S, Hagemann, S, Gortner, L, Huse, K, Remschmidt, H, Bettecken, T, Meitinger, T, Schäfer, H, Hebebrand, J, Hinney, A. 2004. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89: 157-162.
- Wang, J, Scully, K, Zhu, X, Cai, L, Zhang, J, Prefontaine, GG, Krones, A, Ohgi, KA, Zhu, P, Garcia-Bassets, I, Liu, F, Taylor, H, Lozach, J, Jayes, FL, Korach, KS, Glass, CK, Fu, X-D, Rosenfeld, MG. 2007. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446: 882-887.
- Way, JC, Chalfie, M. 1988. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 54: 5-16.
- Weiss, J, Meeks, JJ, Hurley, L, Raverot, G, Frassetto, A, Jameson, JL. 2003. Sox3 Is Required for Gonadal Function, but Not Sex Determination, in Males and Females. *Mol Cell Biol* 23: 8084-8091.
- Williams, DC, Van Frank, RM, Muth, WL, Burnett, JP. 1982. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* 215: 687-689.
- Wit, JM, Drayer, NM, Jansen, M, Walenkamp, MJ, Hackeng, WH, Thijssen, JH, Van den Brande, JL. 1989. Total deficiency of growth hormone and prolactin, and partial deficiency of thyroid stimulating hormone in two Dutch families: a new variant of hereditary pituitary deficiency. *Horm. Res* 32: 170-177.
- Wood, HB, Episkopou, V. 1999. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of Development* 86: 197-201.
- Woods, KS, Cundall, M, Turton, J, Rizotti, K, Mehta, A, Palmer, R, Wong, J, Chong, WK, Al-Zyoud, M, El-Ali, M, Otonkoski, T, Martinez-Barbera, J-P, Thomas, PQ, Robinson, IC, Lovell-Badge, R, Woodward, KJ, Dattani, MT. 2005. Over- and Underdosage of SOX3 Is Associated with Infundibular Hypoplasia and Hypopituitarism. *Am J Hum Genet* 76: 833-849.
- Wu, W, Cogan, JD, Pfaffle, RW, Dasen, JS, Frisch, H, O'Connell, SM, Flynn, SE, Brown, MR, Mullis, PE, Parks, JS, Phillips III, JA, Rosenfeld, MG. 1998.

- Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 18: 147-149.
- Xu, L, Lavinsky, RM, Dasen, JS, Flynn, SE, McInerney, EM, Mullen, T-M, Heinzl, T, Szeto, D, Korzus, E, Kurokawa, R, Aggarwal, AK, Rose, DW, Glass, CK, Rosenfeld, MG. 1998. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 395: 301-306.
- Xu, Y, Baldassare, M, Fisher, P, Rathbun, G, Oltz, EM, Yancopoulos, GD, Jessell, TM, Alt, FW. 1993. LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 227-231.
- Yun, S, Saijoh, Y, Hirokawa, KE, Kopinke, D, Murtaugh, LC, Monuki, ES, Levine, EM. 2009. Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* 136: 3895-3906.
- Zhadanov, AB, Bertuzzi, S, Taira, M, Dawid, IB, Westphal, H. 1995. Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene Lhx3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. *Developmental Dynamics* 202: 354-364.
- Zhang, X, Li, S, Xiao, X, Jia, X, Wang, P, Shen, H, Guo, X, Zhang, Q. 2002. Mutational screening of 10 genes in Chinese patients with microphthalmia and/or coloboma. *Mol Vis* 15: 2911-2918.
- Zhao, Y, Mailloux, CM, Hermes, E, Palkovits, M, Westphal, H. 2010. A role of the LIM-homeobox gene Lhx2 in the regulation of pituitary development. *Dev Biol* 337: 313-323.
- Zhao, Y, Morales, DC, Hermes, E, Lee, W-K, Pfaff, SL, Westphal, H. 2006. Reduced expression of the LIM-homeobox gene Lhx3 impairs growth and differentiation of Rathke's pouch and increases cell apoptosis during mouse pituitary development. *Mechanisms of Development* 123: 605-613.
- Zhu, X, Gleiberman, AS, Rosenfeld, MG. 2007. Molecular Physiology of Pituitary Development: Signaling and Transcriptional Networks. *Physiological Reviews* 87: 933 -963.
- Zhu, X, Zhang, J, Tollkuhn, J, Ohsawa, R, Bresnick, EH, Guillemot, F, Kageyama, R, Rosenfeld, MG. 2006. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev* 20: 2739-2753.
- Zhukov, A, Schürenberg, M, Jansson, Ö, Areskoug, D, Buijs, J. 2004. Integration of Surface Plasmon Resonance with Mass Spectrometry: Automated Ligand Fishing and Sample Preparation for MALDI MS Using a Biacore 3000 Biosensor. *J Biomol Tech* 15: 112-119.
- Zuber, ME, Gestri, G, Viczian, AS, Barsacchi, G, Harris, WA. 2003. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130: 5155-5167.

Zuber, ME, Perron, M, Philpott, A, Bang, A, Harris, WA. 1999. Giant Eyes in *Xenopus laevis* by Overexpression of XOptx2. *Cell* 98: 341-352.

ANNEXES

Annexe I : Oligonucléotides utilisés pour l'amplification génomique et le séquençage des cinq exons de *LHX2*. La taille des amplicons et les séquences oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification (A) et pour le séquençage (B) sont indiquées.

A

Exon	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide anti-sens	Taille de l'amplicon (pb)
1	LHX2-Ex1-F2 : GGACACCTAGCGGCTTCAG	LHX2-Ex1-R2 : TCGGTTTCAACCTTGTTTCC	867
2	LHX2-Ex2-F : GTTCTGAACCGCCCAGAAAT	LHX2-Ex2-R : CTCCCCAAATTGCTGCTTTA	581
3	LHX2-Ex3-F : CAGGCCTGGGTCAAAATCTA	LHX2-Ex3-R : CTTCTGCCTAGCAAAGTGG	872
4	LHX2-Ex4-F : GGAGTTCAATCGGCCATCAA	LHX2-Ex4-R : ACAGGCTGGAGAGGTGAAGA	703
5	LHX2-Ex5-F : CTCACCTATCTATAGCCCCA	LHX2-Ex5-R : TCTTCCAAGTTGTTCTCGG	793

B

Exon	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide anti-sens
1	LHX2-Ex1-seqF : CTCTGTCCTAGTCTCCTGCT	LHX2-Ex1-seqR : GAAGGACGCTCCCCAAACTT
2	LHX2-Ex2-seqF : ATGGAAATGGGCCTTTTGGG	LHX2-Ex2-seqR : AACCTCTCCTGGGACTAAA
3	LHX2-Ex3-seqF1 : TTCGTCTTGAGGAGGGGATT	LHX2-Ex3-seqR1 : TTATCAGAGACAAGGCCCTG
3	LHX2-Ex3-seqF2 : ATGAAGGACAGCCTGGTCTA	LHX2-Ex3-seqR2 : ACGTCGGCATGGTTGAAGTG
4	LHX2-Ex4-seqF : AGACATGCAGCAGGGTTAAGG	LHX2-Ex4-seqR : CACACAGAGAAGCAGACACA
5	LHX2-Ex5-seqF : CAGCAGAGCTCTGAGTGAAG	LHX2-Ex5-seqR : CAGGCGAGATCCTAAAATG

Annexe II : Composition du kit Crystal Screen (Hampton Research)

Crystal Screen HT™ - HR2-130 Scoring Sheet	
1. (A1)	0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2. (A2)	0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
3. (A3)	0.4 M Ammonium phosphate monobasic
4. (A4)	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate
5. (A5)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
6. (A6)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
7. (A7)	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 1.4 M Sodium acetate trihydrate
8. (A8)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% v/v 2-Propanol
9. (A9)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
10. (A10)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
11. (A11)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 1.0 M Ammonium phosphate monobasic
12. (A12)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v 2-Propanol
13. (B1)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400
14. (B2)	0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 28% v/v Polyethylene glycol 400
15. (B3)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000
16. (B4)	0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.5 M Lithium sulfate monohydrate
17. (B5)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
18. (B6)	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000
19. (B7)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% v/v 2-Propanol
20. (B8)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 25% w/v Polyethylene glycol 4,000
21. (B9)	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
22. (B10)	0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
23. (B11)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400
24. (B12)	0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 20% v/v 2-Propanol
25. (C1)	0.1 M Imidazole pH 6.5, 1.0 M Sodium acetate trihydrate
26. (C2)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
27. (C3)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 20% v/v 2-Propanol
28. (C4)	0.2 M Sodium acetate trihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000
29. (C5)	0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
30. (C6)	0.2 M Ammonium sulfate, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000
31. (C7)	0.2 M Ammonium sulfate, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
32. (C8)	2.0 M Ammonium sulfate
33. (C9)	4.0 M Sodium formate
34. (C10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Sodium formate
35. (C11)	0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.8 M Potassium phosphate monobasic
36. (C12)	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 8% w/v Polyethylene glycol 8,000
37. (D1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 8% w/v Polyethylene glycol 4,000
38. (D2)	0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
39. (D3)	0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 2% v/v Polyethylene glycol 400, 2.0 M Ammonium sulfate
40. (D4)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 20% v/v 2-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000
41. (D5)	0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 10% v/v 2-Propanol, 20% w/v Polyethylene glycol 4,000
42. (D6)	0.05 M Potassium phosphate monobasic, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000
43. (D7)	30% w/v Polyethylene glycol 1,500
44. (D8)	0.2 M Magnesium formate dihydrate
45. (D9)	0.2 M Zinc acetate dihydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000
46. (D10)	0.2 M Calcium acetate hydrate, 0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000
47. (D11)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Ammonium sulfate
48. (D12)	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium phosphate monobasic

Crystal Screen HT™ - HR2-130 Scoring Sheet	
49. (E1)	2.0 M Sodium chloride, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000
50. (E2)	0.5 M Sodium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.01 M Hexadecyltrimethylammonium bromide
51. (E3)	25% v/v Ethylene glycol
52. (E4)	35% v/v 1,4-Dioxane
53. (E5)	2.0 M Ammonium sulfate, 5% v/v 2-Propanol
54. (E6)	1.0 M Imidazole pH 7.0
55. (E7)	10% w/v Polyethylene glycol 1,000, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000
56. (E8)	1.5 M Sodium chloride, 10% v/v Ethanol
57. (E9)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 2.0 M Sodium chloride
58. (E10)	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
59. (E11)	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 1.0 M 1,6-Hexanediol
60. (E12)	0.1 M Cadmium chloride hydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v Polyethylene glycol 400
61. (F1)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
62. (F2)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 2.0 M Ammonium sulfate
63. (F3)	0.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 1.0 M Lithium sulfate monohydrate
64. (F4)	0.5 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 2% v/v Ethylene imine polymer
65. (F5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 35% v/v tert-Butanol
66. (F6)	0.01 M Iron(III) chloride hexahydrate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 10% v/v Jeffamine® M-600®
67. (F7)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 2.5 M 1,6-Hexanediol
68. (F8)	0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate
69. (F9)	0.1 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.1 M Potassium phosphate monobasic, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 2.0 M Sodium chloride
70. (F10)	0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 12% w/v Polyethylene glycol 20,000
71. (F11)	1.6 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 10% v/v 1,4-Dioxane
72. (F12)	0.05 M Cesium chloride, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 30% v/v Jeffamine® M-600®
73. (G1)	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 1.8 M Ammonium sulfate
74. (G2)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
75. (G3)	0.01 M Zinc sulfate heptahydrate, 0.1 M MES monohydrate pH 6.5, 25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
76. (G4)	1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5
77. (G5)	0.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
78. (G6)	0.1 M HEPES pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000, 5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
79. (G7)	0.1 M HEPES pH 7.5, 20% v/v Jeffamine® M-600®
80. (G8)	0.1 M Sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.6 M Ammonium sulfate
81. (G9)	0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Ammonium formate
82. (G10)	0.05 M Cadmium sulfate hydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.0 M Sodium acetate trihydrate
83. (G11)	0.1 M HEPES pH 7.5, 70% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
84. (G12)	0.1 M HEPES pH 7.5, 4.3 M Sodium chloride
85. (H1)	0.1 M HEPES pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000, 8% v/v Ethylene glycol
86. (H2)	0.1 M HEPES pH 7.5, 20% w/v Polyethylene glycol 10,000
87. (H3)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 3.4 M 1,6-Hexanediol
88. (H4)	0.1 M Tris pH 8.5, 25% v/v tert-Butanol
89. (H5)	0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.0 M Lithium sulfate monohydrate
90. (H6)	1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 12% v/v Glycerol
91. (H7)	0.2 M Ammonium phosphate monobasic, 0.1 M Tris pH 8.5, 50% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
92. (H8)	0.1 M Tris pH 8.5, 20% v/v Ethanol
93. (H9)	0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
94. (H10)	0.1 M Sodium chloride, 0.1 M BICINE pH 9.0, 20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
95. (H11)	0.1 M BICINE pH 9.0, 2.0 M Magnesium chloride hexahydrate
96. (H12)	0.1 M BICINE pH 9.0, 2% v/v 1,4-Dioxane, 10% w/v Polyethylene glycol 20,000

Annexe III : Composition du kit Salt RX (Hampton Research)

SaltRx HT™ - HR2-136 Scoring Sheet	
1. (A1)	1.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
2. (A2)	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
3. (A3)	1.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
4. (A4)	1.5 M Ammonium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
5. (A5)	1.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
6. (A6)	3.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
7. (A7)	3.5 M Ammonium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
8. (A8)	3.5 M Ammonium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
9. (A9)	2.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
10. (A10)	2.2 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
11. (A11)	2.2 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
12. (A12)	3.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
13. (B1)	3.2 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
14. (B2)	3.2 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5
15. (B3)	1.0 M Ammonium citrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
16. (B4)	1.8 M Ammonium citrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
17. (B5)	1.0 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
18. (B6)	2.0 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
19. (B7)	0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
20. (B8)	0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
21. (B9)	1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
22. (B10)	1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
23. (B11)	0.4 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
24. (B12)	0.4 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
25. (C1)	0.4 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
26. (C2)	0.7 M Magnesium formate dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
27. (C3)	2.0 M Sodium formate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
28. (C4)	2.0 M Sodium formate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
29. (C5)	2.0 M Sodium formate, 0.1 M Tris pH 8.5
30. (C6)	3.5 M Sodium formate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
31. (C7)	3.5 M Sodium formate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
32. (C8)	3.5 M Sodium formate, 0.1 M Tris pH 8.5
33. (C9)	1.2 M DL-Malic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
34. (C10)	2.2 M DL-Malic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
35. (C11)	1.4 M Sodium malonate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
36. (C12)	2.4 M Sodium malonate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
37. (D1)	2.5 M Ammonium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
38. (D2)	2.5 M Ammonium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
39. (D3)	2.5 M Ammonium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5
40. (D4)	6.0 M Ammonium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
41. (D5)	6.0 M Ammonium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
42. (D6)	6.0 M Ammonium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5
43. (D7)	1.5 M Sodium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
44. (D8)	1.5 M Sodium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
45. (D9)	1.5 M Sodium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5
46. (D10)	4.0 M Sodium nitrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
47. (D11)	4.0 M Sodium nitrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
48. (D12)	4.0 M Sodium nitrate, 0.1 M Tris pH 8.5

SaltRx HT™ - HR2-136 Scoring Sheet	
49. (E1)	1.0 M Ammonium phosphate monobasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
50. (E2)	1.8 M Ammonium phosphate monobasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
51. (E3)	1.5 M Ammonium phosphate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
52. (E4)	2.4 M Ammonium phosphate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
53. (E5)	1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 5.0
54. (E6)	1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 6.9
55. (E7)	1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 8.2
56. (E8)	1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 5.0
57. (E9)	1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 6.9
58. (E10)	1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 8.2
59. (E11)	0.5 M Succinic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
60. (E12)	1.0 M Succinic acid pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
61. (F1)	1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
62. (F2)	1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
63. (F3)	1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5
64. (F4)	2.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
65. (F5)	2.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
66. (F6)	2.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5
67. (F7)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
68. (F8)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
69. (F9)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
70. (F10)	1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
71. (F11)	1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
72. (F12)	1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
73. (G1)	1.0 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
74. (G2)	1.0 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
75. (G3)	1.0 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
76. (G4)	1.8 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
77. (G5)	1.8 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
78. (G6)	1.8 M Magnesium sulfate hydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
79. (G7)	0.7 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
80. (G8)	0.7 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
81. (G9)	0.7 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
82. (G10)	1.0 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
83. (G11)	1.3 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
84. (G12)	1.4 M Ammonium tartrate dibasic, 0.1 M Tris pH 8.5
85. (H1)	0.6 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
86. (H2)	1.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
87. (H3)	0.6 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
88. (H4)	1.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5
89. (H5)	0.5 M Potassium thiocyanate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
90. (H6)	0.5 M Potassium thiocyanate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
91. (H7)	0.5 M Potassium thiocyanate, 0.1 M Tris pH 8.5
92. (H8)	4.0 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
93. (H9)	4.0 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
94. (H10)	4.0 M Ammonium acetate, 0.1 M Tris pH 8.5
95. (H11)	35% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
96. (H12)	60% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0

Annexe IV : Composition du kit Index (Hampton Research)

Index HT™ - HR2-134 Scoring Sheet	
1. (A1)	0.1 M Citric acid pH 3.5, 2.0 M Ammonium sulfate
2. (A2)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 2.0 M Ammonium sulfate
3. (A3)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 2.0 M Ammonium sulfate
4. (A4)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 2.0 M Ammonium sulfate
5. (A5)	0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Ammonium sulfate
6. (A6)	0.1 M Tris pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate
7. (A7)	0.1 M Citric acid pH 3.5, 3.0 M Sodium chloride
8. (A8)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 3.0 M Sodium chloride
9. (A9)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 3.0 M Sodium chloride
10. (A10)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 3.0 M Sodium chloride
11. (A11)	0.1 M HEPES pH 7.5, 3.0 M Sodium chloride
12. (A12)	0.1 M Tris pH 8.5, 3.0 M Sodium chloride
13. (B1)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 0.3 M Magnesium formate dihydrate
14. (B2)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 0.5 M Magnesium formate dihydrate
15. (B3)	0.1 M HEPES pH 7.5, 0.5 M Magnesium formate dihydrate
16. (B4)	0.1 M TRIS pH 8.5, 0.3 M Magnesium formate dihydrate
17. (B5)	1.26 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.14 M Potassium phosphate dibasic, pH 5.6
18. (B6)	0.49 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.91 M Potassium phosphate dibasic, pH 6.9
19. (B7)	0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 1.344 M Potassium phosphate dibasic, pH 8.2
20. (B8)	0.1 M HEPES pH 7.5, 1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
21. (B9)	1.8 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0
22. (B10)	0.8 M Succinic acid pH 7.0
23. (B11)	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0
24. (B12)	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0
25. (C1)	3.5 M Sodium formate pH 7.0
26. (C2)	1.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0
27. (C3)	2.4 M Sodium malonate pH 7.0
28. (C4)	35% v/v Tacsimate pH 7.0
29. (C5)	60% v/v Tacsimate pH 7.0
30. (C6)	0.1 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 1.5 M Ammonium sulfate
31. (C7)	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.5% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
32. (C8)	1.0 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 1% w/v Polyethylene glycol 3,350
33. (C9)	1.1 M Sodium malonate pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
34. (C10)	1.0 M Succinic acid pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
35. (C11)	1.0 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% w/v Polyethylene glycol 8,000
36. (C12)	15% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 2% w/v Polyethylene glycol 3,350
37. (D1)	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
38. (D2)	0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
39. (D3)	0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
40. (D4)	0.1 M Citric acid pH 3.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
41. (D5)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
42. (D6)	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
43. (D7)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
44. (D8)	0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
45. (D9)	0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
46. (D10)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
47. (D11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 28% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
48. (D12)	0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

Index HT™ - HR2-134 Scoring Sheet	
49. (E1)	0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
50. (E2)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
51. (E3)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
52. (E4)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
53. (E5)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Tris pH 8.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
54. (E6)	0.05 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
55. (E7)	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
56. (E8)	0.2 M Potassium chloride, 0.05 M HEPES pH 7.5, 35% v/v Pentaerythritol propoxylate (5/4 PO/OH)
57. (E9)	0.05 M Ammonium sulfate, 0.05 M BIS-TRIS pH 6.5, 30% v/v Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO/OH)
58. (E10)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 45% v/v Polypropylene glycol P 400
59. (E11)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 22% w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5,100
60. (E12)	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 20% w/v Polyvinylpyrrolidone K 15
61. (F1)	0.2 M L-Proline, 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol 3,350
62. (F2)	0.2 M Trimethylamine N-oxide dihydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
63. (F3)	5% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
64. (F4)	0.005 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.005 M Cadmium chloride hydrate, 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
65. (F5)	0.1 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 17% w/v Polyethylene glycol 10,000
66. (F6)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
67. (F7)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
68. (F8)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
69. (F9)	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
70. (F10)	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
71. (F11)	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
72. (F12)	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
73. (G1)	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
74. (G2)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
75. (G3)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
76. (G4)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
77. (G5)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
78. (G6)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
79. (G7)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
80. (G8)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
81. (G9)	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
82. (G10)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
83. (G11)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
84. (G12)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
85. (H1)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350
86. (H2)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
87. (H3)	0.2 M Sodium malonate pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88. (H4)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89. (H5)	0.1 M Succinic acid pH 7.0, 15% w/v Polyethylene glycol 3,350
90. (H6)	0.2 M Sodium formate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91. (H7)	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
92. (H8)	0.1 M Magnesium formate dihydrate, 15% w/v Polyethylene glycol 3,350
93. (H9)	0.05 M Zinc acetate dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
94. (H10)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95. (H11)	0.1 M Potassium thiocyanate, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
96. (H12)	0.15 M Potassium bromide, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000

Annexe V : Composition du kit Natrix (Hampton Research)

Natrix HT™ - HR2-131 Scoring Sheet	
1. (A1)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 1.8 M Lithium sulfate monohydrate
2. (A2)	0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 2.5 M Ammonium sulfate
3. (A3)	0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
4. (A4)	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 10% v/v Polyethylene glycol 400
5. (A5)	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 5% w/v Polyethylene glycol 8,000
6. (A6)	0.1 M Ammonium sulfate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000
7. (A7)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 15% v/v 2-Propanol
8. (A8)	0.1 M Ammonium acetate, 0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 0.6 M Sodium chloride
9. (A9)	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 10% v/v Polyethylene glycol 400
10. (A10)	0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 5% w/v Polyethylene glycol 4,000
11. (A11)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.0 M Lithium sulfate monohydrate
12. (A12)	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.8 M Lithium sulfate monohydrate
13. (B1)	0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.7 M Ammonium sulfate
14. (B2)	0.1 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 15% v/v 2-Propanol
15. (B3)	0.04 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
16. (B4)	0.04 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
17. (B5)	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000
18. (B6)	0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 1.3 M Lithium sulfate monohydrate
19. (B7)	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 2.0 M Ammonium sulfate
20. (B8)	0.1 M Ammonium acetate, 0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% v/v 2-Propanol
21. (B9)	0.2 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 0.9 M 1,6-Hexanediol
22. (B10)	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 15% v/v Polyethylene glycol 400
23. (B11)	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000
24. (B12)	0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000
25. (C1)	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
26. (C2)	0.2 M Potassium chloride, 0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000
27. (C3)	0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000
28. (C4)	0.05 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 1.6 M Lithium sulfate monohydrate
29. (C5)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 4.0 M Lithium chloride
30. (C6)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 1.6 M Ammonium sulfate
31. (C7)	0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
32. (C8)	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 1.7 M 1,6-Hexanediol
33. (C9)	0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 2.5 M 1,6-Hexanediol
34. (C10)	0.1 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 15% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
35. (C11)	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 5% v/v Polyethylene glycol 400
36. (C12)	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 10% v/v Polyethylene glycol 400
37. (D1)	0.2 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 20% v/v Polyethylene glycol 200
38. (D2)	0.2 M Ammonium acetate, 0.15 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 5% w/v Polyethylene glycol 4,000
39. (D3)	0.1 M Ammonium acetate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 5% w/v Polyethylene glycol 8,000
40. (D4)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 7.5, 1.6 M Ammonium sulfate
41. (D5)	0.1 M Potassium chloride, 0.015 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 7.5, 10% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
42. (D6)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 7.5, 5% v/v 2-Propanol
43. (D7)	0.05 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 7.5, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
44. (D8)	0.2 M Potassium chloride, 0.05 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000
45. (D9)	0.025 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.8 M Ammonium sulfate
46. (D10)	0.005 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.9 M 1,6-Hexanediol
47. (D11)	0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% v/v Polyethylene glycol 400
48. (D12)	0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000

Natrix HT™ - HR2-131 Scoring Sheet	
49. (E1)	0.04 M LiCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 5.5, 30% v/v MPD, 0.02 M Hexamine cobalt(III) chloride
50. (E2)	0.08 M NaCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 5.5, 35% v/v MPD, 0.02 M Hexamine cobalt(III) chloride
51. (E3)	0.012 M NaCl, 0.08 M KCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 5.5, 45% v/v MPD, 0.02 M Hexamine cobalt(III) chloride
52. (E4)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 5.5, 40% v/v MPD, 0.02 M Hexamine cobalt(III) chloride
53. (E5)	0.002 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.8 M Ammonium sulfate, 0.0005 M Spermine
54. (E6)	0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 35% v/v Tacsimate pH 6.0, 0.001 M Spermine
55. (E7)	0.1 M NaCl, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 10% w/v PEG 4,000, 0.0005 M Spermine
56. (E8)	0.05 M KCl, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 10% w/v PEG 8,000, 0.0005 M Spermine, 0.0005 M L-Argininamide dihydrochloride
57. (E9)	0.1 M KCl, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 16% w/v PEG 1,000, 0.0005 M Spermine
58. (E10)	0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.002 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 15% v/v 2-Propanol, 0.001 M Spermine
59. (E11)	0.075 M NaCl, 0.002 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 30% w/v 1,6-Hexanediol, 0.0005 M Spermine
60. (E12)	0.02 M Magnesium sulfate hydrate, 0.002 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 25% v/v MPD, 0.0005 M Spermine
61. (F1)	0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 30% v/v MPD
62. (F2)	0.08 M NaCl, 0.012 M KCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 30% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
63. (F3)	0.08 M NaCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 35% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
64. (F4)	0.08 M Strontium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 35% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
65. (F5)	0.08 M KCl, 0.02 M Barium chloride dihydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 40% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
66. (F6)	0.08 M KCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 45% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
67. (F7)	0.08 M NaCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 45% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
68. (F8)	0.08 M NaCl, 0.02 M Barium chloride dihydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 45% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
69. (F9)	0.012 M NaCl, 0.08 M KCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 50% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
70. (F10)	0.08 M KCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 6.0, 55% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
71. (F11)	0.018 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% v/v 2-Propanol, 0.003 M Spermine
72. (F12)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MOPS pH 7.0, 2.0 M Ammonium sulfate, 0.0005 M Spermine
73. (G1)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 40% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.002 M Spermine, 0.002 M Hexamine cobalt(III) chloride
74. (G2)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MOPS pH 7.0, 55% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.005 M Hexamine cobalt(III) chloride
75. (G3)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 15% v/v 2-Propanol, 0.001 M Hexamine cobalt(III) chloride, 0.001 M Spermine
76. (G4)	0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MOPS pH 7.0, 25% v/v 1,4-Dioxane, 0.001 M Spermine
77. (G5)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.002 M Barium chloride dihydrate, 0.05 M MOPS pH 7.0, 30% v/v 1,4-Dioxane
78. (G6)	0.001 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.002 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M MOPS pH 7.0, 15% v/v MPD
79. (G7)	0.08 M Strontium chloride hexahydrate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 20% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
80. (G8)	0.08 M NaCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 30% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
81. (G9)	0.04 M LiCl, 0.08 M Strontium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 30% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
82. (G10)	0.04 M LiCl, 0.08 M Strontium chloride hexahydrate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 30% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
83. (G11)	0.08 M NaCl, 0.012 M KCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 35% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
84. (G12)	0.012 M NaCl, 0.08 M KCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 40% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
85. (H1)	0.08 M NaCl, 0.02 M Barium chloride dihydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 40% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
86. (H2)	0.08 M NaCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 40% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
87. (H3)	0.08 M KCl, 0.02 M Barium chloride dihydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 40% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
88. (H4)	0.08 M KCl, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 50% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
89. (H5)	0.08 M KCl, 0.04 M Na cacodylate trihydrate pH 7.0, 60% v/v MPD, 0.012 M Spermine tetrahydrochloride
90. (H6)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.002 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.5, 2.0 M Ammonium sulfate, 0.001 M Spermine
91. (H7)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M PIPES pH 7.5, 4% w/v PEG 8,000, 0.001 M Spermine
92. (H8)	0.015 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.002 M Barium chloride dihydrate, 0.05 M PIPES pH 7.5, 7% v/v 2-Propanol, 0.0005 M Spermine
93. (H9)	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M PIPES pH 7.5, 10% w/v 1,6-Hexanediol, 0.001 M Spermine
94. (H10)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.5, 15% v/v MPD, 0.0015 M Spermine
95. (H11)	0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.5, 28% v/v PEG 400, 0.002 M Spermine
96. (H12)	0.002 M Copper(II) chloride dihydrate, 0.05 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.8 M Lithium sulfate monohydrate, 0.0005 M Spermine

Annexe VI : Composition du kit ProComplex (Qiagen)

Location	Crystallization condition
A1 1,A1	0.1 M Tris pH 8, 25% (w/v) PEG 350 MME
A2 1,A2	0.1 Calcium acetate, 0.1 M MES pH 6, 15% (v/v) PEG 400
A3 1,A3	0.1 Lithium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 20% (v/v) PEG 400
A4 1,A4	0.1 M Tris pH 8, 25% (v/v) PEG 400
A5 1,A5	0.1 M MES pH 6.5, 15% (w/v) PEG 550 MME
A6 1,A6	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Na/K phosphate pH 6.5, 25% (w/v) PEG 1000
A7 1,B1	0.1 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 7.5, 20% (w/v) PEG 1500
A8 1,B2	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate pH 5.5, 10% (w/v) PEG 2000 MME
A9 1,B3	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M MES pH 6, 20% (w/v) PEG 2000 MME
A10 1,B4	0.1 M Potassium chloride, 0.1 M Tris pH 8, 15% (w/v) PEG 2000 MME
A11 1,B5	0.1 M HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 2000 MME
A12 1,B6	0.2 M Sodium acetate, 0.1 M Sodium citrate pH 5.5, 5% (w/v) PEG 4000
B1 1,C1	0.2 M Lithium sulfate, 0.1 M Tris pH 7.5, 5% (w/v) PEG 4000
B2 1,C2	0.1 M Calcium acetate, 0.1 M Sodium acetate pH 4.5, 10% (w/v) PEG 4000
B3 1,C3	0.2 M Sodium acetate, 0.1 M Sodium citrate pH 5.5, 10% (w/v) PEG 4000
B4 1,C4	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M MES pH 6.5, 10% (w/v) PEG 4000
B5 1,C5	0.1 M Magnesium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 10% (w/v) PEG 4000
B6 1,C6	0.1 M HEPES pH 7, 10% (w/v) PEG 4000, 10% (v/v) Isopropanol
B7 1,D1	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate pH 4, 15% (w/v) PEG 4000
B8 1,D2	0.1 M Magnesium chloride, 0.1 M Sodium citrate pH 5, 15% (w/v) PEG 4000
B9 1,D3	0.1 M Sodium cacodylate pH 6, 15% (w/v) PEG 4000
B10 1,D4	0.15 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6, 15% (w/v) PEG 4000
B11 1,D5	0.1 M HEPES pH 7, 15% (w/v) PEG 4000
B12 1,D6	0.1 M Magnesium chloride, 0.1 M HEPES pH 7, 15% (w/v) PEG 4000
C1 2,A1	0.15 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8, 15% (w/v) PEG 4000
C2 2,A2	0.1 M Sodium citrate pH 4.5, 20% (w/v) PEG 4000
C3 2,A3	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium acetate pH 5, 20% (w/v) PEG 4000
C4 2,A4	0.2 M Lithium sulfate, 0.1 M MES pH 6, 20% (w/v) PEG 4000
C5 2,A5	0.1 M Tris pH 8, 20% (w/v) PEG 4000
C6 2,A6	0.15 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7, 20% (w/v) PEG 4000
C7 2,B1	0.1 M Sodium citrate pH 5.6, 20% (w/v) PEG 4000, 20% (v/v) Isopropanol
C8 2,B2	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8, 20% (w/v) PEG 4000
C9 2,B3	0.1 M Sodium cacodylate pH 5.5, 25% (w/v) PEG 4000
C10 2,B4	0.15 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 5.5, 25% (w/v) PEG 4000
C11 2,B5	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5, 25% (w/v) PEG 4000
C12 2,B6	0.2 M Potassium iodide, 0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 4000
D1 2,C1	0.2 M Sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 4000
D2 2,C2	0.1 M MES pH 6.5, 10% (w/v) PEG 5000 MME, 12% (v/v) 1-propanol
D3 2,C3	0.1 M Potassium chloride, 0.1 M HEPES pH 7, 15% (w/v) PEG 5000 MME
D4 2,C4	0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 7.5, 20% (w/v) PEG 5000 MME
D5 2,C5	0.1 M Magnesium chloride, 0.1 M MES pH 6, 8% (w/v) PEG 6000
D6 2,C6	0.15 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8, 8% (w/v) PEG 6000
D7 2,D1	0.1 M Sodium citrate pH 5.5, 15% (w/v) PEG 6000
D8 2,D2	0.1 M Magnesium acetate, 0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5, 15% (w/v) PEG 6000
D9 2,D3	0.1 M MES pH 6.5, 15% (w/v) PEG 6000, 5% (v/v) MPD
D10 2,D4	0.1 M Potassium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 15% (w/v) PEG 6000
D11 2,D5	0.1 M Tris pH 7.5, 15% (w/v) PEG 6000
D12 2,D6	0.1 M Tris pH 8.5, 20% (w/v) PEG 6000

Location	Crystallization condition
E1	3,A1 0.1 M Magnesium acetate, 0.1 M Sodium acetate pH 4.5, 8% (w/v) PEG 8000
E2	3,A2 0.1 M Sodium citrate pH 5, 8% (w/v) PEG 8000
E3	3,A3 0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Sodium cacodylate pH 6, 8% (w/v) PEG 8000
E4	3,A4 0.1 M HEPES pH 7, 8% (w/v) PEG 8000
E5	3,A5 0.1 M Tris pH 8, 8% (w/v) PEG 8000
E6	3,A6 0.1 M Calcium acetate, 0.1 M Sodium cacodylate pH 5.5, 12% (w/v) PEG 8000
E7	3,B1 0.1 M Sodium dihydrogen phosphate pH 6.5, 12% (w/v) PEG 8000
E8	3,B2 0.1 M Magnesium acetate, 0.1 M MOPS pH 7.5, 12% (w/v) PEG 8000
E9	3,B3 0.2 M Sodium chloride, 0.1 M HEPES pH 7.5, 12% (w/v) PEG 8000
E10	3,B4 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 12% (w/v) PEG 8000
E11	3,B5 0.1 M Sodium citrate pH 5, 20% (w/v) PEG 8000
E12	3,B6 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 20% (w/v) PEG 8000
F1	3,C1 0.1 M HEPES pH 7, 20% (w/v) PEG 8000
F2	3,C2 0.2 M Lithium chloride, 0.1 M Tris pH 8, 20% (w/v) PEG 8000
F3	3,C3 0.1 M Magnesium acetate, 0.1 M MES pH 6.5, 10% (w/v) PEG 10000
F4	3,C4 0.1 M HEPES pH 7, 18% (w/v) PEG 12000
F5	3,C5 0.1 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8, 8% (w/v) PEG 20000
F6	3,C6 0.1 M HEPES pH 7, 15% (w/v) PEG 20000
F7	3,D1 0.1 M MES pH 6.5, 0.5 M Ammonium sulfate
F8	3,D2 0.1 M Sodium acetate pH 5, 1 M Ammonium sulfate
F9	3,D3 0.1 M MES pH 6.5, 1 M Ammonium sulfate
F10	3,D4 0.1 M Tris pH 8, 1 M Ammonium sulfate
F11	3,D5 0.1 M Sodium acetate pH 5, 1.5 M Ammonium sulfate
F12	3,D6 0.1 M HEPES pH 7, 1.5 M Ammonium sulfate
G1	4,A1 0.1 M Tris pH 8, 1.5 M Ammonium sulfate
G2	4,A2 0.1 M Sodium acetate pH 5, 2 M Ammonium sulfate
G3	4,A3 0.1 M HEPES pH 7, 2 M Ammonium sulfate
G4	4,A4 0.1 M Tris pH 8, 2 M Ammonium sulfate
G5	4,A5 1 M Potassium chloride, 0.1 M HEPES pH 7, 1 M Ammonium sulfate
G6	4,A6 0.1 M Sodium acetate pH 5, 2 M Sodium formate
G7	4,B1 0.1 M Tris pH 7.5, 3 M Sodium formate
G8	4,B2 0.8 M Potassium/Sodium phosphate pH 7.5
G9	4,B3 1.3 M Potassium/Sodium phosphate pH 7.0
G10	4,B4 1.6 M Potassium/Sodium phosphate pH 6.5
G11	4,B5 0.1 M HEPES pH 7.5, 1 M Sodium acetate
G12	4,B6 0.1 M HEPES pH 7, 1 M Sodium citrate
H1	4,C1 0.1 M Sodium citrate pH 6, 2 M Sodium chloride
H2	4,C2 0.1 M MES pH 6.5, 1 M Lithium sulfate
H3	4,C3 0.1 M Tris pH 8, 1.6 M Lithium sulfate
H4	4,C4 1.4 M Sodium malonate pH 6.0
H5	4,C5 0.1 M Tris pH 8, 1.2 M Sodium/Potassium tartrate
H6	4,C6 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M Magnesium sulfate
H7	4,D1 0.1 M Sodium acetate pH 5, 15% (v/v) MPD, 2% (w/v) PEG 4000
H8	4,D2 0.05 M Calcium acetate, 0.1 M Sodium cacodylate pH 6, 25% (v/v) MPD
H9	4,D3 0.1 M Imidazole pH 7, 50% (v/v) MPD
H10	4,D4 0.05 M Magnesium chloride, 0.1 M MES pH 6.5, 10% (v/v) Isopropanol, 5% (w/v) PEG 4000
H11	4,D5 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% (v/v) Isopropanol
H12	4,D6 0.1 M Sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8, 15% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) MPD

Annexe VII : Composition du kit PEG suite (Qiagen)

Location	Crystallization condition
A1 1,A1	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 40% (v/v) PEG 200
A2 1,A2	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 30% (v/v) PEG 300
A3 1,A3	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 30% (v/v) PEG 400
A4 1,A4	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (v/v) PEG 550 MME
A5 1,A5	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 1000
A6 1,A6	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 2000 MME
A7 1,B1	0.1 M MES pH 6.5, 40% (v/v) PEG 200
A8 1,B2	0.1 M MES pH 6.5, 30% (v/v) PEG 300
A9 1,B3	0.1 M MES pH 6.5, 30% (v/v) PEG 400
A10 1,B4	0.1 M MES pH 6.5, 25% (v/v) PEG 550 MME
A11 1,B5	0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 1000
A12 1,B6	0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 2000 MME
B1 1,C1	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 40% (v/v) PEG 200
B2 1,C2	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 30% (v/v) PEG 300
B3 1,C3	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 30% (v/v) PEG 400
B4 1,C4	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (v/v) PEG 550 MME
B5 1,C5	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 1000
B6 1,C6	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 2000 MME
B7 1,D1	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 40% (v/v) PEG 200
B8 1,D2	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 30% (v/v) PEG 300
B9 1,D3	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 30% (v/v) PEG 400
B10 1,D4	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (v/v) PEG 550 MME
B11 1,D5	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (w/v) PEG 1000
B12 1,D6	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (w/v) PEG 2000 MME
C1 2,A1	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 3000
C2 2,A2	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 4000
C3 2,A3	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 6000
C4 2,A4	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25% (w/v) PEG 8000
C5 2,A5	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 20% (w/v) PEG 10000
C6 2,A6	0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 15% (w/v) PEG 20000
C7 2,B1	0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 3000
C8 2,B2	0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 4000
C9 2,B3	0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 6000
C10 2,B4	0.1 M MES pH 6.5, 25% (w/v) PEG 8000
C11 2,B5	0.1 M MES pH 6.5, 20% (w/v) PEG 10000
C12 2,B6	0.1 M MES pH 6.5, 15% (w/v) PEG 20000
D1 2,C1	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 3000
D2 2,C2	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 4000
D3 2,C3	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 6000
D4 2,C4	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 25% (w/v) PEG 8000
D5 2,C5	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 20% (w/v) PEG 10000
D6 2,C6	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5, 15% (w/v) PEG 20000
D7 2,D1	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (w/v) PEG 3000
D8 2,D2	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (w/v) PEG 4000
D9 2,D3	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (w/v) PEG 6000
D10 2,D4	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 25% (w/v) PEG 8000
D11 2,D5	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 20% (w/v) PEG 10000
D12 2,D6	0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 15% (w/v) PEG 20000

Location		Crystallization condition
E1	3,A1	0.2 M Sodium fluoride, 20% (w/v) PEG 3350
E2	3,A2	0.2 M Potassium fluoride, 20% (w/v) PEG 3350
E3	3,A3	0.2 M Ammonium fluoride, 20% (w/v) PEG 3350
E4	3,A4	0.2 M Lithium chloride, 20% (w/v) PEG 3350
E5	3,A5	0.2 M Magnesium chloride, 20% (w/v) PEG 3350
E6	3,A6	0.2 M Sodium chloride, 20% (w/v) PEG 3350
E7	3,B1	0.2 M Calcium chloride, 20% (w/v) PEG 3350
E8	3,B2	0.2 M Potassium chloride, 20% (w/v) PEG 3350
E9	3,B3	0.2 M Ammonium chloride, 20% (w/v) PEG 3350
E10	3,B4	0.2 M Sodium iodide, 20% (w/v) PEG 3350
E11	3,B5	0.2 M Potassium iodide, 20% (w/v) PEG 3350
E12	3,B6	0.2 M Ammonium iodide, 20% (w/v) PEG 3350
F1	3,C1	0.2 M Sodium thiocyanate, 20% (w/v) PEG 3350
F2	3,C2	0.2 M Potassium thiocyanate, 20% (w/v) PEG 3350
F3	3,C3	0.2 M Lithium nitrate, 20% (w/v) PEG 3350
F4	3,C4	0.2 M Magnesium nitrate, 20% (w/v) PEG 3350
F5	3,C5	0.2 M Sodium nitrate, 20% (w/v) PEG 3350
F6	3,C6	0.2 M Potassium nitrate, 20% (w/v) PEG 3350
F7	3,D1	0.2 M Ammonium nitrate, 20% (w/v) PEG 3350
F8	3,D2	0.2 M Magnesium formate, 20% (w/v) PEG 3350
F9	3,D3	0.2 M Sodium formate, 20% (w/v) PEG 3350
F10	3,D4	0.2 M Potassium formate, 20% (w/v) PEG 3350
F11	3,D5	0.2 M Ammonium formate, 20% (w/v) PEG 3350
F12	3,D6	0.2 M Lithium acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G1	4,A1	0.2 M Magnesium acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G2	4,A2	0.2 M Zinc acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G3	4,A3	0.2 M Sodium acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G4	4,A4	0.2 M Calcium acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G5	4,A5	0.2 M Potassium acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G6	4,A6	0.2 M Ammonium acetate, 20% (w/v) PEG 3350
G7	4,B1	0.2 M Lithium sulfate, 20% (w/v) PEG 3350
G8	4,B2	0.2 M Magnesium sulfate, 20% (w/v) PEG 3350
G9	4,B3	0.2 M Sodium sulfate, 20% (w/v) PEG 3350
G10	4,B4	0.2 M Potassium sulfate, 20% (w/v) PEG 3350
G11	4,B5	0.2 M Ammonium sulfate, 20% (w/v) PEG 3350
G12	4,B6	0.2 M di-Sodium tartrate, 20% (w/v) PEG 3350
H1	4,C1	0.2 M K/Na tartrate, 20% (w/v) PEG 3350
H2	4,C2	0.2 M di-Ammonium tartrate, 20% (w/v) PEG 3350
H3	4,C3	0.2 M Sodium phosphate, 20% (w/v) PEG 3350
H4	4,C4	0.2 M di-Sodium phosphate, 20% (w/v) PEG 3350
H5	4,C5	0.2 M Potassium phosphate, 20% (w/v) PEG 3350
H6	4,C6	0.2 M di-Potassium phosphate, 20% (w/v) PEG 3350
H7	4,D1	0.2 M Ammonium phosphate, 20% (w/v) PEG 3350
H8	4,D2	0.2 M di-Ammonium phosphate, 20% (w/v) PEG 3350
H9	4,D3	0.2 M tri-Lithium citrate, 20% (w/v) PEG 3350
H10	4,D4	0.2 M tri-Sodium citrate, 20% (w/v) PEG 3350
H11	4,D5	0.2 M tri-Potassium citrate, 20% (w/v) PEG 3350
H12	4,D6	0.18 M tri-Ammonium citrate, 20% (w/v) PEG 3350

RESUME

Pathologie moléculaire

Afin d'évaluer l'implication de deux facteurs de transcription d'expression pituitaire dans des formes syndromiques de croissance, nous avons suivi une approche « gènes candidats » et analysé les gènes *SIX6* et *LHX2*. Chez la souris, ces deux gènes sont exprimés dans l'œil et la glande pituitaire en développement. Les ADN de patients présentant un phénotype évocateur de celui observé chez les souris invalidées pour ces gènes ont été séquencés (*SIX6* : n=74, *LHX2* : n=76). L'analyse moléculaire de *SIX6* n'a pas permis de mettre en évidence de mutation pouvant expliquer le phénotype des patients. Le retentissement de deux variations hétérozygotes faux-sens de *LHX2* retrouvées chez deux patients a été évalué *in vitro* : ces variations n'ont pas d'effet délétère. Nous avons cependant montré un rôle potentiel régulateur transcriptionnel de *LHX2* sur deux gènes d'expression pituitaire (*PRL*, *POU1F1*) et confirmé son rôle au niveau du promoteur *TSHβ*, ainsi qu'une action en synergie avec *POU1F1* sur les promoteurs de ces gènes.

L'identification de deux mutations hétérozygotes composites de *LHX3* chez un patient issu d'une union non consanguine a permis d'assigner à ce gène l'association de certains symptômes décrits uniquement chez des patients consanguins. Alors que, classiquement, les porteurs hétérozygotes sont de phénotype normal, nous avons mis en évidence un effet dominant négatif de l'une de ces mutations pouvant rendre compte d'une anomalie phénotypique observée chez deux apparentés hétérozygotes (limitation de la rotation du cou). La sévérité du phénotype associé au génotype hétérozygote composite a justifié la réalisation de deux diagnostics anténataux.

Etude de la régulation du gène *GH* humain par *POU1F1*.

POU1F1, facteur de transcription essentiel à la différenciation pituitaire terminale, est associé en pathologie humaine à un déficit combiné en hormone de croissance (GH), prolactine (PRL) et thyrostimuline (TSHβ). L'expression de *GH* est régulée par *POU1F1* via deux sites de fixation sur son promoteur et trois au niveau d'un « Locus Control Region » localisé 15 Kb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *GH*. Les différents cofacteurs nécessaires à la transcription du gène *GH* ne sont pas connus actuellement. L'identification de deux mutations faux-sens situées dans le domaine de transactivation (TAD) de *POU1F1* et associées à un déficit isolé en GH a été le point de départ de cette étude visant à identifier les partenaires de *POU1F1* au locus *GH*.

Une approche par résonance plasmonique de surface a permis de définir les interactions de *POU1F1* (normale et mutées) sur ses séquences cibles ADN ; des extraits nucléaires de lignées pituitaires ont également été utilisés dans le but de fixer les partenaires de *POU1F1* qui seront identifiés par spectrométrie de masse. Une approche d'analyse du TAD par cristallographie a débuté pour modéliser la structure tridimensionnelle de ce domaine qui est très probablement modifiée par les mutations identifiées.

ABSTRACT

Mutation analysis

To evaluate the implication of two pituitary transcription factors in syndromic forms of short stature, we used a candidate gene approach and analysed *SIX6* and *LHX2*. In mice, these two genes were shown to be expressed in developing eye and pituitary gland. DNA from patients with phenotypic features reminiscent of those reported in syndromic forms in invalidated mice were sequenced (*SIX6*: n=74, *LHX2*: n=75). *SIX6* molecular analysis did not revealed any mutation. The functional effect of two identified *LHX2* heterozygous missense variations was assessed *in vitro*: there are not deleterious. We have shown a potential transcriptional regulator role of *LHX2* on two pituitary genes (*PRL*, *POU1F1*), confirmed the role of *LHX2* on the *TSHβ* promoter, and shown a synergic effect with *POU1F1* on these promoters.

The identification of two compound heterozygous *LHX3* mutations in a patient born to a non consanguineous union permitted us to implicate this gene in the association of symptoms described in other consanguineous patients. Heterozygous carriers are usually phenotypically normal; we, however, demonstrated a dominant negative effect of one of these mutations, which could explain the mild phenotype observed in two heterozygous family members. The severity of the phenotype associated with the compound heterozygous genotype led to two antenatal diagnoses.

Regulation of the human *GH* gene by *POU1F1*

POU1F1, a key transcription factor essential to terminal pituitary differentiation, is associated, in human pathology, with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and thyroid stimulating hormone (TSHβ) deficiencies. *GH* expression is regulated by *POU1F1* via two binding sites on its promoter and three other sites in a locus control region located 15 Kb upstream from the transcription start site. To date, co-factors necessary to *GH* transcription are not known. The identification of two new mutations located in the *POU1F1* transactivation domain (TAD) associated with isolated growth hormone deficiency was the starting point of this study performed in order to better understand mechanisms involved in regulation of *GH* expression.

Surface plasmon resonance permitted us to define interaction properties between *POU1F1* (wild-type and mutated) on its target sequences. Nuclear extracts from pituitary cell lines are now used to recover *POU1F1* co-factors that can subsequently be identified by mass spectrometry. A crystallographic study was started to determine the TAD tridimensional structure which is probably altered by the identified mutations.

