

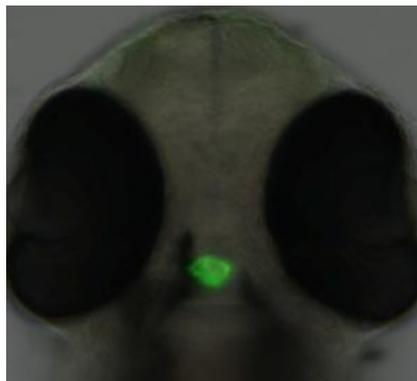


**UNIVERSITE DE LIEGE**  
**Faculté des Sciences**

**GIGA-Research**  
**Laboratoire d'Organogenèses et Régénération**

**Professeur J.A. MARTIAL**

**ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SOX4B**  
**DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES**  
**HYPOPHYSAIRES DU ZEBRAFISH**



**Quiroz O'Donova Yobhana**  
**Promoteur : Dr. Marc Muller**

**Thèse présentée**  
**en vue de l'obtention du grade de**  
**Docteur en Sciences**

**Année académique 2013-2014**





*Je tiens remercier chaleureusement à le professeur Joseph Martial pour son accueil et pour son premier email de contact qui m'a permis de faire partie de son groupe et effectuer mes premiers pas dans la biologie moléculaire.*

*Un grand merci de tout cœur à Marc Muller pour ces conseils et commentaires judicieux qui m'ont toujours été d'une grande aide pendant mes années des études de PhD. Je dois confesser que son aide et son immense gentillesse m'ont sincèrement touchée.*

*J'aimerais remercier aussi aux membres de LBMGG, leur sympathie et bonne humeur ont donné des couleurs à mes journées pendant mes années des études. Un merci aussi à tout le groupe de Mullerines et à la nouvelle génération de doctorantes du groupe zebrafish, merci pour tous les chouettes moments vécu, au labo ou dehors.*

*Je remercie également à ma famille O'Donova, qui ont toujours cru en moi et surtout avoir été mon exemple de courage et de force. Je tiens dédier exclusivement cette thèses à mon grand-père Aurelio, qui tout le long de son existence a été à mon côté pour me soutenir quelle que soit la situation, et qui malgré lui m'a quitté a moitié de cette aventure, je lui doit dire **I CAN DO IT abuelo!!!**.*

*Je ne voudrais pas oublier aussi mon chère oncle Aurelio, muchas gracias pour tout.*

*Également, je tiens à remercier à mes parents, frère et sœur pour leurs encouragements et soutien inconditionnel.*

*Giovanni, merci pour ton soutien dans tout moment et sûr tout pour avoir cru en moi. Je ne sais pas que je serais devenu sans toi. Je t'aime....*

# TABLE DES MATIERES

## I. INTRODUCTION

<b>1. L'HYPOPHYSE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Généralités et développement chez les vertèbres .....	1
1.2 Différences morphologiques entre poissons et mammifères.....	2
1.3 Ontogenèse chez la souris.....	5
1.4 Ontogenèse de l'hypophyse chez le zébra.....	8
1.5. Cascade de gènes qui jouent un rôle dans le développement de l'adénohypophyse.....	11
1.5.1. Hedgehog (SHH).....	12
1.6 Les marqueurs précoces pour la formation et induction de la préplacode.....	13
1.6.1 PITX3.....	13
1.7. Spécification et survie de l'adénohypophyse .....	13
1.7.1 FGF3.....	13
1.7.2 ASCL1a.....	14
1.8. Les acteurs de différenciation cellulaire dans l'adénohypophyse .....	14
1.8.1 DELTA/NOTCH.....	14
1.8.2 PIT1.....	14
1.8.3 Complexes EYA1/SIX1.....	16
1.8.4 LIM3/LHX3.....	16
1.8.5 GATA2.....	17
<b>2. LE POISSON ZEBRE COMME UN MODELE ANIMAL .....</b>	<b>20</b>
2.1 Généralités sur le zebrafish.....	20
2.2 Développement .....	20
<b>3. LA FAMILLE DES FACTEURS SOX.....</b>	<b>24</b>
3.1 Généralités .....	24
3.2 Classification .....	24
3.3 Propriétés.....	27
3.4 Les fonctions des protéines Sox.....	29
3.5 Les facteurs Sox dans le développement hypophysaire.....	29
3.5.1 SOX2.....	29
3.5.2 SOX3.....	31
3.5.3 SOX4.....	32
3.5.4 SOX4 et pancréas.....	32
3.5.5 SOX4 et hématopoïèses.....	33

3.5.6 SOX4 dans l'hypophyse humaine.....	34
<b>4. OBJECTIFS DU TRAVAIL.....</b>	<b>36</b>
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>37</b>
2.1 Les hormones gonadotrophines.....	37
2.2 Un type cellulaire gonadotrope dans l'hypophyse de zebrafish.....	40
2.3 La fonction de <i>sox4b</i> dans l'hypophyse de zébra.....	45
2.4 Résumé de l'article.....	45
2.5 Article: THE HMG-BOX TRANSCRIPTION FACTOR SOX4B IS REQUIRED FOR PITUITARY EXPRESSION OF GATA2A AND SPECIFICATION OF THYROTROPE AND GONADOTROPE CELLS IN ZEBRAFISH .....	46
<b>III. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>77</b>
3.1 Un type cellulaire gonadotrope dans l'hypophyse chez le zebrafish.....	77
3.2 Fonction du facteur <i>Sox4b</i> dans le développement de l'hypophyse.....	78
<b>IV. CONCLUSIONS.....</b>	<b>88</b>
4.1 Concernant LH.....	88
4.2 Concernant <i>Sox4b</i> et <i>gata2a</i> .....	88
<b>V. REFERENCES.....</b>	<b>92</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH	Adrenocorticotropine
AH	Adénohypophyse
ANR	Anterior Neural Ridge
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
AP	Antéropostérieur
aPD	<i>Anterior pars distales</i>
ASCL1a	achaete- scute-like 1a (pituitary absent mutant)
BCIP	5 Bromo-4-Chloro 3-indolyl Phosphate
BMP	Bone Morphogenic Protein
DLX	distal less related homeobox genes
DPF	Days post fertilization
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fig	Figure
FSH	Hormone stimulant les follicules
GFP	Green fluorescent protein
GH	Hormone de croissance
HPF	Hours post fertilization
HN	Neurohypophyse
LH	Hormone Lutéinisante
Lhx3	facteur LIM homéo domaine
MOs	Antisens Morpholino
MSH	Hormone stimulant les melanocytes
NE	Ectoderme neural
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
PAX	facteur Paired homeobox
PI	<i>Pars Intermedia</i>
PIT1	POU homéo-domaine protéine
PRL	Prolactine
pPD	<i>Posterior pars distales</i>
PPE	Préplacode ectodermique
RP	Poche de Rathke
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase Chain Reaction

SHH	Sonic Hedgehog
Sox	Sry like HMG-BOX
TSH	Hormone Stimulant la Thyroide
WISH	Whole Mount <i>in situ</i> Hybridizations
Wnt	Wingless-type
WT	Wild Type (type sauvage)



# 1. L'HYPOPHYSE

## 1.1 Généralités et développement chez les vertébrés

L'hypophyse, appelée aussi glande pituitaire, est située à la base du crâne dans une loge hypophysaire appelée « selle turcique » et est reliée au cerveau (diencéphale) par la tige pituitaire dans tous les vertébrés. Élément clé du système endocrinien, mais d'une petite taille que ne laisse pas envisager sa complexité et sa grande importance, elle joue en effet un rôle essentiel et indispensable dans le contrôle du développement, de la croissance, de la maturation sexuelle et de l'homéostasie, par ses fonctions endocriniennes propres et son rôle régulateur de différentes autres glandes du corps (Scully and Rosenfeld 2002).

Chez tous les vertébrés, l'hypophyse est constituée d'une structure ectodermique de double origine c'est-à-dire provenant de deux ébauches morphologiquement et embryologiquement distinctes:

- le lobe antérieur (adénohypophyse) et le lobe intermédiaire dérivent de l'ectoderme oral, alors que
- le lobe postérieur (neurohypophyse) dérive de l'ectoderme neural (Dasen and Rosenfeld 1999).

Deux hormones sont sécrétées par la neurohypophyse : vasopressine (ou vasotocine chez les poissons) et ocytocine (ou isotocine chez les poissons), ces deux hormones étant synthétisées par des neurones hypothalamiques. L'ocytocine agit sur plusieurs organes, principalement sur les cellules musculaires lisses de la glande mammaire et de l'utérus en le contractant. La vasopressine présente une action antidiurétique au niveau des reins, rôle important en tant que régulateur de l'homéostasie des fluides. Elle possède également des fonctions dans les vaisseaux sanguins. Ces deux hormones sont transportées jusqu'aux terminaisons axonales dans la neurohypophyse et sont libérées dans la circulation générale.

Le lobe antérieur (adénohypophyse) présente essentiellement une fonction endocrine et contient six types cellulaires caractérisés par le type d'hormone qu'ils produisent et sécrètent : les corticotropes (adrenocorticotropine: ACTH) impliquées dans le stress (Lolait, Stewart et al. 2007, Racca, Piccione et al. 2012); les thyrotropes (hormone stimulant la thyroïde: TSH) qui régulent la quantité d'hormones synthétisée et sécrétée par la thyroïde (Estrada, Buckey et al. 2013); les gonadotropes qui sécrètent les gonadotropines (hormones lutéinisante: LH - et folliculostimulante: FSH) régissant le fonctionnement des gonades (Wiser, Shehata et al. 2013) et la reproduction (Gamble, Resuehr et al. 2013) (Shao, Arvidsson et al. 2013) ; les somatotropes sécrètent l'hormone de croissance (GH) qui

régule la croissance des os et générale; et enfin les lactotropes qui sécrètent la prolactine (PRL), stimulatrice de la lactation (Ollier, Zhao et al. 2013) (Hirai, Nishita et al. 2013, Whittington and Wilson 2013), impliquée dans la reproduction des poissons (Whittington and Wilson 2013) et le cancer du sein (Xu J et al.2013). De plus, chez les poissons, l'adénohypophyse possède un type cellulaire supplémentaire : les somatolactotropes qui, jusqu'à présent, n'ont pas été observées chez les autres vertébrés. Ces cellules sécrètent la somatolactine (SL) qui semble être impliquée dans le métabolisme du calcium et du phosphate (Lu, Wen et al. 1995, Kakizawa, Kaneko et al. 1997), la régulation acide-base (Kakizawa, Kaneko et al. 1996), la maturation des gonades (Planas, Swanson et al. 1992, Rand-Weaver, Swanson et al. 1992) et le contrôle de la lipolyse (Mingaro *et al.* 2002). Signalons que la FSH, la LH et la TSH sont des polypeptides hétérodimères qui possèdent en commun la sous-unité GSU $\alpha$  et se distinguent par des sous-unités  $\beta$  spécifiques (Dasen and Rosenfeld 2001) (Fig. 1).



**Figure 1. Les hormones FSH, LH et TSH sont des polypeptides hétérodimères.**

Elles possèdent une sous unité  $\beta$  distincte (FSH $\beta$ , LH $\beta$  et TSH $\beta$ ) et une sous unité  $\alpha$  commune, GSU $\alpha$ .

Le lobe intermédiaire (*pars intermedia*, PI) produit et sécrète l'hormone stimulant les mélanocytes (MSH), celle-ci est encodée par le même gène que l'ACTH des corticotropes, les deux hormones dérivent du clivage différentiel d'une protéine précurseur, la pro-opiomélanocortine (POMC).

Chez le poisson zèbre adulte, les différentes lignées de cellules endocrines sont distribuées selon une configuration spatiale bien précise (Fig. 3) : La *pars distalis* antérieure (aPD) contient les lactotropes et les corticotropes, tandis que les somato-thyréo-somatolacto- et gonadotropes sont localisées dans la *pars distalis* postérieure (pPD); finalement la PI contient les mélanotropes (Liu, Huang et al. 2003).

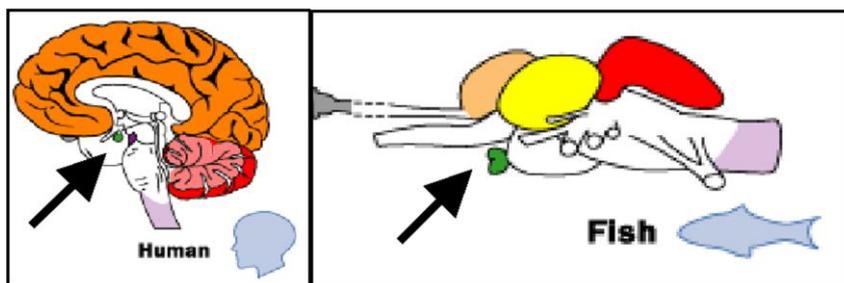
## 1.2 Différences morphologiques entre poissons et mammifères

Chez les mammifères, la neurohypophyse constitue la partie postérieure de la glande hypophysaire (Fig. 3). Les cellules qui sécrètent ces hormones sont en réalité des neurones qui se trouvent dans l'hypothalamus, ces neurones envoient leurs axones par la tige neurale jusqu'à la partie *nervosa* de la neurohypophyse où les hormones sont libérées, celle-ci ne produit donc pas ses propres hormones mais les distribue juste sous forme de neurosécrétions. Contrairement aux mammifères, la

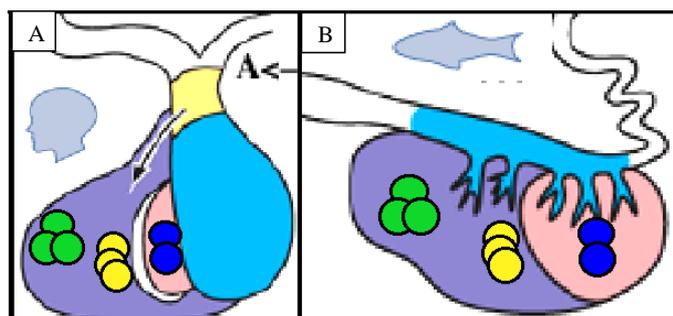
neurohypophyse chez le téléostéen ne forme pas un lobe distinct et est positionnée dorsalement plutôt qu'en arrière pendant les stades larvaire, juvénile et adulte (bleu clair, Fig. 3b). Elle est aussi composée de projections de cellules neurosécrétoires hypothalamiques qui s'entrecroisent avec l'adénohypophyse (Fig. 3b); elle est morphologiquement visible et est considérée comme la neurohypophyse (Chapman, Sawitzke et al. 2005).

L'hypothalamus contrôle la fonction de l'adénohypophyse par la sécrétion de libérines ou de statines, qui sont chez les mammifères déversées dans le système porte hypophysaire pour atteindre leurs cellules cibles. Un tel système porte n'existe pas chez les poissons, le contrôle s'effectue plus directement *via* des projections de neurones hypothalamiques dans l'hypophyse antérieure.

L'hypophyse du poisson présente une autre particularité morphologique qui la rend intéressante pour l'étude de la différenciation finale des cellules hypophysaires : les différentes populations cellulaires ont une localisation bien distincte au sein de l'organe adulte (Kaneko 1996) contrairement aux mammifères où les différents types cellulaires sont plus mélangés. Il est donc plus aisé chez les téléostéens d'observer et d'identifier les différents types cellulaires (Fig. 4).



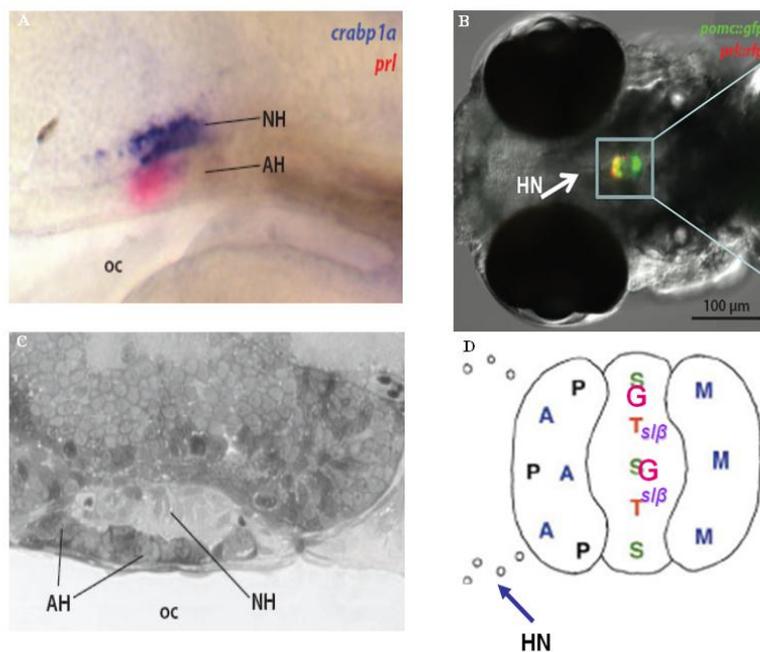
**Figure 2.** Les deux images montrent la localisation de l'hypophyse chez l'humain et le poisson (flèche) (Liem 2001 3era edition).



**Figure 3. Organisation conservée de l'hypophyse de vertébré adulte.** Les panneaux indiquent l'emplacement de l'hypophyse chez les humains et les poissons (A-B). Chez les deux espèces, l'adénohypophyse est divisée en deux lobes (violet et rose). Chez les téléostéens, le long de l'axe antéropostérieur se présente la *pars distalis* (PD- violet) et la partie intermédiaire (PI- rose). On observe que la position de cellules endocrines est en grande partie conservée : Prl et les cellules Ach, en partie antérieure (aPD, vert), les cellules sécrétrices Gh, Tsh, Lh et

Fsh dans la partie médiane (pPD, jaune), et les cellules sécrétrices Msh postérieures (PI, bleu foncé) (Liem 2001 3era edition).

Un type de cellules additionnel adénohypophysaire est présent chez le poisson : les somatolactotropes qui se trouvent dans la pPD pendant l'étape embryonnaire et, à l'âge adulte, dans la PI et aussi dans le pPD (Zhu, Stiller et al. 2004) (Lopez, Nica et al. 2006) .



**Figure 4. L'axe hypothalamo-hypophysaire dans le zebrafish.**

L'âge des poissons : A) 2dpf, (B) 3dpf, (C) 7dpf) respectivement. L'expression des gènes est visualisée par hybridation *in situ* ou dans une lignée transgénique, (oc) désigne la cavité buccale (A, B). (C) coupe longitudinale colorée au bleu de toluidine (vue latérale), révélant la morphologie de la glande pituitaire. (A) Double hybridation *in situ* entre *prl* dans l'adénohypophyse (AH) et *crabp1*, protéine cellulaire liant l'acide rétinolique, dans l'ébauche neurohypophysaire (NH). (B) image *in vivo* de larves transgéniques contenant le promoteur prolactine (*prl*) couplé à la protéine fluorescente rouge (RFP) et le promoteur proopiomelanocortine (*pomc*) contrôlant l'expression de la protéine fluorescente verte (GFP), respectivement (Lohr and Hammerschmidt 2011); (A, C) vue latérale ; (B, D) vue ventrale. (D) schéma de la composition de l'hypophyse chez le poisson zèbre à 120hpf, A, corticotropes ; M, melanotropes ; P lactotropes (*prl*) ; S somatotropes (*gh*) ; T thyrotropes (*tsh*) ; G gonadotropins (*lhβ*, *fshβ*), Somatolactotropes (*sl*). (HN), neurones hypothalamiques qui expriment la β-endorphine (*pomc*) (Herzog, Zeng et al. 2003).

### 1.3 Ontogenèse chez la souris

Dans tous les mammifères, la première observation morphologique de la formation de l'adénohypophyse est l'évagination de l'ectoderme oral au niveau du stomodeum, appelée poche de Rathke.

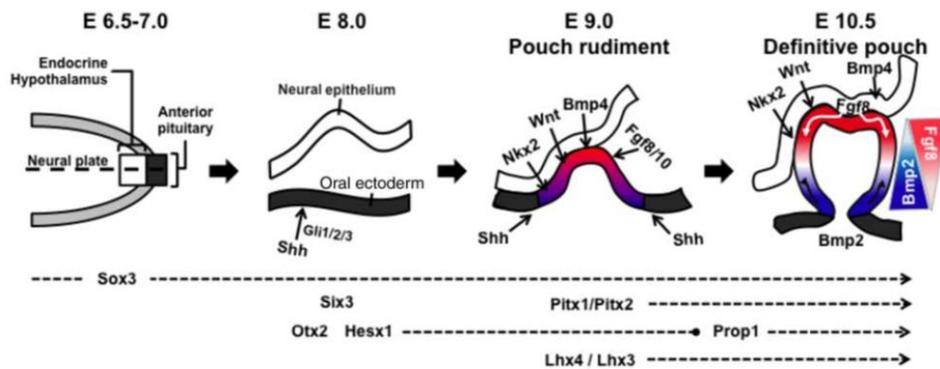
L'engagement de l'hypophyse est induit par des signaux émanant du diencéphale ventral. Cette induction nécessite un contact direct entre ce dernier et l'ectoderme oral (Gleiberman *et al.* 1999). La portion de l'ectoderme oral directement en contact avec le diencéphale ventral s'invagine pour former la poche de Rathke, le diencéphale ventral de son côté forme une évagination appelée l'infundibulum à cette étape du développement (Fig. 5).

Les facteurs de la superfamille BMP constituent un signal dorsal neuroépithélial critique et requis pour le déclenchement de la formation de la glande pituitaire (Mullis 2001). Chez la souris, BMP4 est exprimé dans le diencéphale ventral; Wnt5a et FGF8 sont également exprimés dans le diencéphale ventral et leur profil d'expression se superpose à celui de BMP4. Un autre facteur de signalisation impliqué dans la formation de l'hypophyse est Sonic hedgehog (Shh), qui est exprimé dans plusieurs centres organisateurs pendant l'embryogenèse et notamment dans l'ectoderme oral au stade e8.0 (Hammerschmidt, Brook *et al.* 1997, Dasen and Rosenfeld 2001). L'expression de Shh, absente dans la région qui formera la poche de Rathke, avec les signaux émanant du diencéphale ventral (BMP4, FGF8/10/18 et Wnt5) va induire la formation de la poche.

Ensuite, les gradients opposés BMP4/FGF et BMP2/Shh, respectivement dorsaux et ventraux, transmettent des signaux de prolifération et de différenciation pour déterminer de manière combinatoire l'identité des cellules ainsi que la nature des facteurs de transcription exprimés dans les cellules de l'adénohypophyse immature (Xiaoyan Zhu *et al.* 2006).

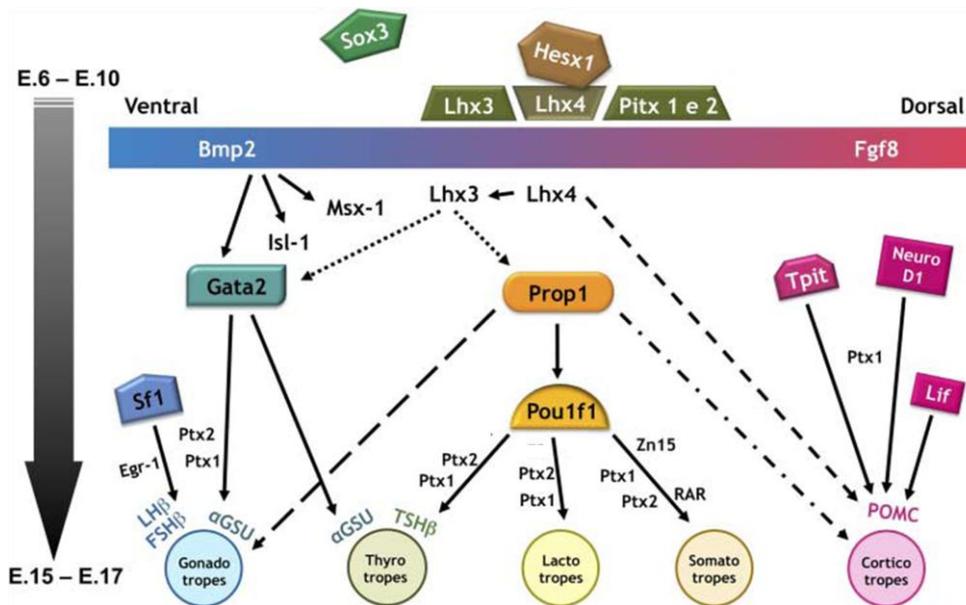
La poche de Rathke continue à s'invaginer, finit par se refermer sur elle-même et se séparer de l'ectoderme oral. Les cellules de la poche prolifèrent ventralement jusqu'à peupler l'entièreté de la partie de la poche qui formera le lobe antérieur.

Par la suite, la différenciation terminale des différentes lignées cellulaires s'effectue par une régulation des marqueurs spécifiques, impliquant des interactions protéine-protéine, synergiques et/ou inhibitrices, entre deux ou plusieurs facteurs de transcription dont l'expression est restreinte à certains types cellulaires (Fig. 6) (Dasen and Rosenfeld 2001).



**Figure 5. Développement de l'hypophyse chez la souris.**

La portion la plus antérieure de la plaque neurale (Anr) donne naissance à l'hypophyse antérieure et la région médiane adjacente constitue l'hypothalamus endocrine. Chez la souris à environ E8, l'ectoderme oral prolifère en réponse au signal Shh, les facteurs de transcription Six3, Otx2, Hex1 et SHH participent dans la formation de la ligne médiane. La prolifération continue à environ E9 en réponse à la signalisation de l'épithélium neural et expriment Bmp4, Fgf8, Wnt2 et Nkx2. A ce stade, l'ectoderme oral commence à s'invaginer pour former une poche rudimentaire qui exprime Lhx3/Lhx4 et Pitx1/2. Bmp2 est exprimée au bord de la poche de Rathke qui est en contact avec l'ectoderme oral et son antagoniste Fgf8 est exprimé par l'épithélium neural. Ainsi, un gradient ventral-dorsal BMP2-FGF8 est défini, qui détermine l'activation des gènes spécifiques à chaque groupe de cellules en fonction de leur position dans la poche de Rathke (de Moraes, Vaisman et al. 2012).



**Figure 6. Activation temporelle et spatiale des facteurs de transcription de l'hypophyse chez la souris**

En réponse à la gradient ventrale -dorsale Bmp2 - Fgf8, des lignées de cellules de l'hypophyse sont déterminés par l'activation ou la répression de chaque facteur de transcription . Les flèches pleines indiquent l'activation de l'expression , des flèches en pointillés indiquent un rôle inconnu dans l'activation d'expression , des flèches en tirets indiquent un rôle défini et flèches mixtes (tirets+points) indiquent l'action d'un facteur important dans le maintien de la fonction cellulaire à long terme. Bmp2 , la protéine morphogénique osseuse 2 ; Egr1 réponse de croissance précoce 1 ; le Fgf8, le facteur de croissance des fibroblastes 8 ; Gata2, Protéine Gata- 2 de liaison ; Hesx1 , Hesx homéobox 1 ; Isl1 , Isl Lim homeobox 1 ; Lhx3 , Lim homeobox 3 ; Lhx , Lim homeobox 4 ; MSX1 , msh homéobox 1 ; NeuroD1 , neurogène différenciation 1 ; Pit1 , classe POU 1 homéobox 1 ; Pitx1 , homéodomaine appariées comme 1 ; Pitx2 , associé – comme homéodomaine 2 ; Pomc , proopiomélanocortine ; Prop1 , prophète de Pit- 1 ; Rar , récepteur de l'acide rétinoïque , Sf1 ,facteur stéroïdogène 1 ; Tpit , T-box 19 ; Zn15 , protéine à doigts de zinc Zn15. Adaptée et modifiée de (de Moraes, Vaisman et al. 2012).

## 1.4 Ontogenèse de l'hypophyse chez le zebrafish

Bien qu'il existe de grandes similitudes au niveau du processus de développement de l'hypophyse chez la souris et le zebrafish, il a été montré que chez ce dernier, l'hypophyse ne présente pas une structure équivalente à la poche de Rathke. Il n'y a pas d'invagination de l'ectoderme oral comme chez la souris. Les cellules s'organisent plutôt en deux domaines dans un schéma bilatéral qui fusionnent en une placode unique à l'extrémité antérieure de l'embryon (Glasgow, Karavanov et al. 1997). Cependant, certains facteurs de transcription qui interviennent au cours de l'ontogenèse chez la souris ont été mis en évidence dans plusieurs espèces de poisson, ce qui suggère que les mécanismes fondamentaux du développement de l'hypophyse sont conservés.

Très tôt, après la fin de la gastrulation à 10hpf pendant le développement de l'embryon du zebrafish, les futures cellules pituitaires sont localisées et dérivées de la région la plus antérieure de la plaque neurale (placode adénohypophysaire) (Toro and Varga 2007). A ce stade, la plaque neurale est délimitée caudalement par la crête neurale et rostralement par la pré-placode ectodermique (PPE) (Schlosser 2005) (Fig. 7). Dans la PPE, les précurseurs sont disposés en configuration spatiale spécifique, avec les futures cellules AH localisées dans le domaine le plus antérieur et médian, appelé : « antérieur neural ridge » (Anr) (Fig. 7) (Dutta, Dietrich et al. 2005).

Vers 18hpf, l'adénohypophyse devient visible sous forme d'un épaississement de l'Anr qui forme la placode hypophysaire. Ensuite, à 24hpf, l'AH forme une structure morphologiquement distincte et est positionnée ventro-rostralement par rapport à l'hypothalamus et dorsalement par rapport au stomodeum (Fig. 7). C'est à ce stade et dans cette position, avant l'internalisation de l'adénohypophyse (23-24 hpf), que les premières cellules se différencient en exprimant les hormones: Prl, Sl $\beta$  et Pomc, (Herzog, Zeng et al. 2003, Lopez, Nica et al. 2006). Notons une différence par rapport à la souris, où la lignée de Prl est établie plus tardivement. C'est également à partir de ce stade que l'on commence à observer une distinction structurale entre la *pars distalis* et la *pars intermedia*.

Vers 26hpf, l'internalisation progressive de l'AH commence et celle-ci acquiert une forme en fer à cheval bordant antérieurement et ventralement le diencéphale, ce qui coïncide avec la formation de la cavité buccale; l'AH atteint sa position finale entre 48 et 72hpf (Herzog, Sonntag et al. 2004, Pogoda and Hammerschmidt 2007). L'expression de la sous-unité commune aux thyrotropes et gonadotropes (*gsua*) peut être détectée à partir de 32hpf, occupant la position centrale de l'AH (pPD). Ensuite, la sous-unité *tsh $\beta$*  et la *gh* apparaissent vers 42 et 44hpf, respectivement (Herzog, Zeng et al. 2003, Nica, Herzog et al. 2004).

Finalement, entre 60-72hpf, l'AH du zebrafish rejoint sa position finale et commence à être incluse dans la fenêtre du cartilage du neurocrâne en développement, tout en conservant son attache à la partie ventrale de l'hypothalamus endocrine (Pogoda and Hammerschmidt 2007). Durant cette période, les différentes lignées cellulaires hypophysaires affichent un motif spécifique le long de l'axe antéro-

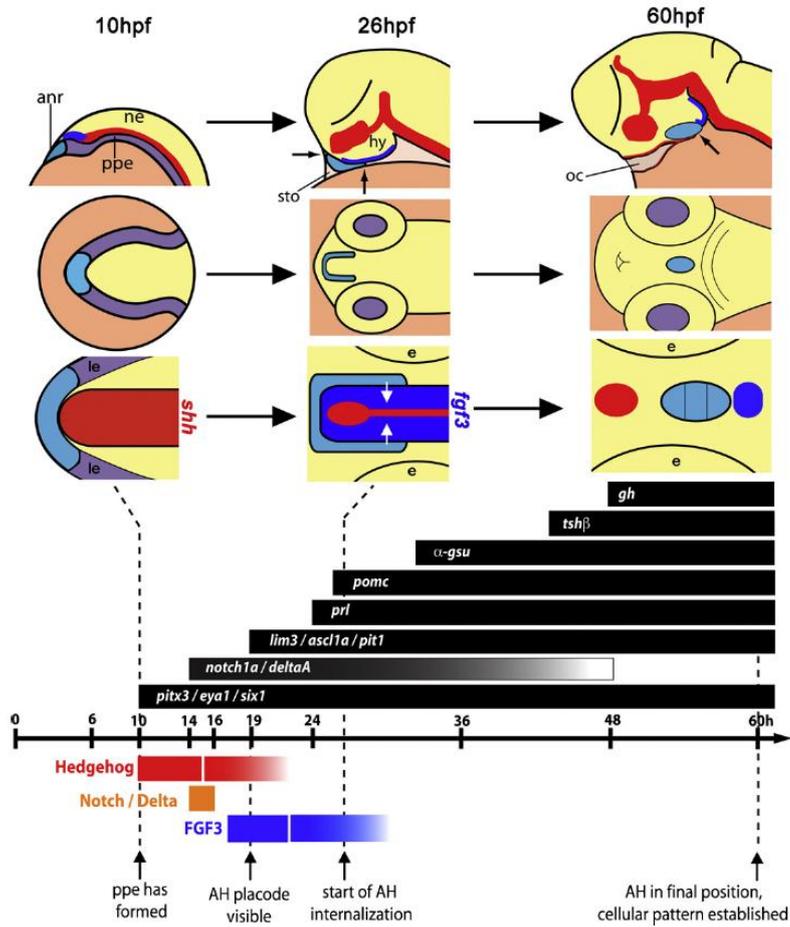
postérieur de la glande ; la *pars distalis* antérieure (aPD) est constituée par les lactotropes et les corticotropes, la partie postérieure de la *pars distalis* (pPD) par les somato-, thyro-, somatolacto- et les gonadotropes, enfin les mélanotropes constituent la *pars intermedia* (PI) (fig.4d.) (Pogoda and Hammerschmidt 2007). Cet arrangement cellulaire antéro-postérieur est maintenu pendant toute la vie du poisson.

D'un point de vue moléculaire chez le zebrafish, on peut distinguer au début du processus dans la PPE les marqueurs *pitx3*, *eyal* et *six1*. Dans le diencéphale ventral, Shh joue un rôle pour l'induction, la croissance et la formation de l'adénohypophyse ; ce que indique que le rôle de Shh a été conservé du poisson à la souris (Herzog, Zeng et al. 2003, Dutta, Dietrich et al. 2005, Zilinski, Shah et al. 2005, Nica, Herzog et al. 2006). La voie Delta/Notch agit dans les premières étapes de la formation de la placode hypophysaire entre 14hpf et 16hpf, (Dutta, Dietrich et al. 2008) proposent l'idée que la différenciation des cellules est régulée par inhibition latérale dans les sous-domaines, avec une augmentation de la différenciation des somatotropes, corticotropes et mélanotropes et une restriction de la différenciation des lactotropes, thyrotropes et gonadotropes. Enfin, l'expression du facteur Fgf3 débute à un stade précoce et induit principalement l'activation des gènes impliqués dans la première étape de spécification adénohypophysaire, affectant par la suite surtout la survie cellulaire (Herzog, Sonntag et al. 2004).

Les premiers gènes spécifiques de l'adénohypophyse apparaissent vers 18hpf, comme le facteur Lim3 qui est crucial pour la formation de toutes les cellules pituitaires, ou encore Pit1 qui intervient dans la différenciation de certaines lignées uniquement (Glasgow, Karavanov et al. 1997, Herzog, Zeng et al. 2003, Nica, Herzog et al. 2004). Ces observations indiquent que l'organisation adénohypophysaire se produit juste après la formation de la placode, bien avant l'internalisation des cellules à l'intérieur de la tête.

Par la suite, à 25hpf, les frontières moléculaires sont définies par le gène *nkx2.2a* qui n'est exprimé que dans la moitié antérieure, tandis que les transcrits du gène *pax7* sont confinés à la partie postérieure de l'AH (Guner, Ozacar et al. 2008) .

De nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans cette cascade de différenciation, certains propres à la lignée hypophysaire et d'autres qui interviennent plus spécifiquement dans la différenciation des cellules pituitaires; ils seront décrits plus en détail ci-dessous.



**Figure 7. Ontogenèse de l'adénohypophyse chez le zebrafish.**

Les trois lignes du haut montrent de manière simplifiée le développement hypophysaire chez le zebrafish à 10, 26 et 60hpf. La première ligne est une vue latérale de la tête de l'embryon ; la deuxième et la troisième sont des vues ventrales ; la troisième se focalise sur la région hypophysaire. L'AH est marquée en bleu, l'ectoderme neural (ne) en jaune et le reste de la pré-placode ectodermique (PPE), qui donnera naissance notamment au cristallin (le), est marqué en mauve. Dans la première et troisième ligne les domaines d'expression de *shh* et *fgf3* sont indiqués respectivement en rouge et bleu foncé. Shh est exprimé d'abord dans le neuroectoderme ventral pour ensuite s'étendre vers l'avant jusqu'à l'Anr, tandis que Fgf3 provient de l'hypothalamus, dorsalement et postérieurement à l'hypophyse. Anr : "antérieur neural ridge" ; e : yeux ; hy: l'hypothalamus ; oc : cavité orale ; sto : ectoderme oral (Pogoda and Hammerschmidt 2009).

## 1.5 Cascade de gènes qui jouent un rôle dans le développement de l'adénohypophyse

Comme mentionné précédemment, le développement hypophysaire a déjà été largement étudié chez la souris, où la génétique inverse (souris KO) et les analyses à base de surexpressions par transgéniques ont fourni des informations cruciales sur le réseau moléculaire contrôlant l'organogenèse de l'AH. Cependant, toutes ces approches nécessitent une connaissance *a priori* du gène ou de la voie qui doit être étudiée. En revanche, la génétique directe vise à identifier les gènes en fonction du phénotype provoqué lors de mutations générées au hasard, sans connaissance préalable de leur nature moléculaire. Des criblages par mutagenèse à grande échelle ont été réalisés chez le zebrafish au cours des années 1990 (Driever, Solnica-Krezel et al. 1996, Haffter and Nusslein-Volhard 1996, Amsterdam, Burgess et al. 1999). Plus récemment, de nombreux criblages supplémentaires à l'aide des tests de dépistage plus spécifiques ou plus sophistiqués ont grandement contribué à la collecte de mutants disponibles aujourd'hui (Muto, Orger et al. 2005, Pogoda, Sternheim et al. 2006). Dans la même période, les outils génomiques ont énormément évolué, facilitant l'identification des mutations induites par hasard (Dahm and Geisler 2006, Ekker, Stemple et al. 2007, Sivasubbu, Balciunas et al. 2007).

Des méthodes de génétique inverse ont été mises en place chez le zebrafish, y compris le knock-down de gènes via l'injection d'oligonucléotides antisens morpholino spécifiques (MOs) (Nasevicius and Ekker 2000), la mutagenèse chimique suivie de la sélection de mutations dans des gènes cibles sélectionnés, également nommée TILLING (targeted induced local lesions in genomes (Wienholds, van Eeden et al. 2003) et l'introduction ciblée de petites délétions par l'intermédiaire de nucléases couplés à des motifs de liaison à l'ADN en doigt de zinc (Doyon, McCammon et al. 2008, Meng and Lin 2008). Elles ont permis d'identifier des centaines de gènes avec des fonctions essentielles chez le poisson zèbre en cours de développement, ainsi que pour sa physiologie et son comportement. Toutes ces approches ont permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans le développement hypophysaire.

Dans la suite, nous allons décrire quelques-uns de ces gènes ainsi que leurs rôles essentiels pour la formation, spécification et différenciation de l'adénohypophyse (Fig. 8).

### 1.5.1 Hedgehog (SHH)

Chez le zebrafish, le signal Hh est exprimé entre 10 et 15hpf. En effet, Shh est exprimé dans l'ectoderme neural adjacent à la PPE, où il est nécessaire pour la spécification initiale de la placode hypophysaire pendant les stades de somitogenèse (Dutta, Dietrich et al. 2005). Pendant la somitogenèse tardive, la voie Hh est en plus requise pour la détermination des différents types cellulaires et pour le maintien de l'expression des gènes de l'adénohypophyse (Fig. 7). En conséquence, la signalisation Hedgehog (Hh) provenant du diencéphale ventral est indispensable pour le développement adénohypophysaire (Sbrogna, Barresi et al. 2003).

Les similitudes entre le zebrafish (Schauerte, van Eeden et al. 1998) et la souris (Treier, O'Connell et al. 2001) suggèrent des rôles similaires de Shh durant la formation de l'hypophyse dans les deux classes de vertébrés, avec la différence que la protéine Shh semble être fournie par différents tissus: l'ectoderme oral chez la souris et le diencéphale ventral dans le poisson.

Chez le zebrafish, la PD se forme au plus près de la source du signal Shh provenant du système nerveux central, tandis que la PI se forme au plus près de la source postérieure de Fgf3. Lorsque la placode pituitaire commence son internalisation, la région centrale /antérieure, qui est la plus proche de la source de Shh, exprime *nkx2.2a* tandis que la région la plus postérieure devient plus distale de la source de Shh et commence à exprimer *pax7*, un gène réprimé par la voie Hh. Cette réponse différentielle au gradient Hh marque la première division de l'adénohypophyse en deux domaines qui formeront la PD et la PI (Guner, Ozacar et al. 2008).

De plus, les protéines Gli, qui interviennent dans la transduction transcriptionnelle du signal Hh chez les vertébrés, permettent de moduler la réponse cellulaire en fonction du signal Hh ; elles sont requises afin d'établir le profil correct de l'axe antéro-postérieur pour déterminer le nombre des différents types cellulaires endocrines dans chaque sous-domaine de la glande (Guner, Ozacar et al. 2008). Ainsi, Gli1 est requis pour un nombre normal de somatotropes, lactotropes et thyrotropes dans la PD ; Gli2a et Gli2b sont requis pour un nombre normal de corticotropes, lactotropes, thyrotropes et somatotropes dans la PD et de mélanotropes dans la PI (Devine, Sbrogna et al. 2009).

## 1.6 Les marqueurs précoces pour la formation et l'induction de la pré-placode

### 1.6.1 Pitx3

La fonction du facteur Pitx3 est requise très tôt dans le développement, son expression commence durant la phase finale de la gastrulation, à 10hpf, dans les cellules qui bordent la plaque neurale antérieure, pour se limiter ensuite à la pré-placode ectodermique (PPE)(Toro and Varga 2007). Les progéniteurs de l'adénohypophyse et du cristallin maintiennent cette expression même après la formation de la placode, au-delà de 72hpf (Dutta, Dietrich et al. 2005, Zilinski, Shah et al. 2005). En conséquence, Pitx3 est requis pour la formation et la spécification de la placode pituitaire à la fin de la gastrulation (Dutta, Dietrich et al. 2005). Remarquons qu'il est probable que Pitx3 regroupe chez le zebrafish les fonctions de Pitx1 et Pitx2 chez les mammifères (Pogoda and Hammerschmidt 2009).

Pitx3 coopère avec les protéines Dlx3b et Dlx4b qui sont exprimées dans la PPE durant les premières étapes de la segmentation (10hpf) afin de déterminer les différents domaines de la PPE. Le profil d'expression des gènes *dlx* ne recouvre que partiellement celui de *pitx3* ; en effet, leurs transcrits sont détectés au sein de la PPE dans une zone plus postérieure que ceux de *pitx3* et dans une zone adjacente du diencéphale (Dutta, Dietrich et al. 2005). Au sein de la PPE antérieure, Dlx3b et Dlx4b limitent la zone compétente pour répondre aux signaux d'induction de l'adénohypophyse et donc favorisent le destin vers le bulbe olfactif. Contrairement à ce qu'on l'observe chez le poisson zèbre, aucun rôle des facteurs Dlx n'a été rapporté dans le développement pituitaire de la souris (Pogoda and Hammerschmidt 2009).

## 1.7 Spécification et survie de l'adénohypophyse

### 1.7.1 Fgf3 :

L'expression de Fgf3 débute pendant les étapes de mi-segmentation (18-22hpf). La signalisation par Fgf3 provient du diencéphale ventral, elle est requise pour le développement de l'adénohypophyse du zebrafish et, lorsque l'ébauche AH a acquis la forme en fer à cheval, elle est aussi nécessaire pour la spécificité et la survie des cellules adénohypophysaires (Herzog, Sonntag et al. 2004).

Des études des mutants *fgf3* montrent qu'ils sont incapables d'initier l'expression des gènes *pit1* et *lim3* et, par conséquent, de former aucun des types de cellules AH. Par ailleurs, à 25hpf, le développement de la PPE est intact et l'ébauche d'AH présente une forme et une taille normale, jusqu'à ce que les cellules de l'adénohypophyse ne meurent par apoptose massive (28-32hpf) (Herzog, Sonntag et al. 2004, Herzog, Sonntag et al. 2004). De plus, la signalisation du gradient Fgf3 est requise, en

association avec celle du gradient Shh, pour l'organisation fonctionnelle de l'AH le long de l'axe antéro-postérieur. Ainsi, des niveaux élevés de Fgf3 sont requis pour la formation de la PI, tandis que la PD requiert de plus faibles niveaux de Fgf3 (Guner, Ozacar et al. 2008).

### 1.7.2 *Ascl1a* :

Le gène *ascl1a* code pour un facteur de transcription bHLH qui est exprimé uniformément de 20 à 48hpf dans toute l'hypophyse, tandis qu'à partir du troisième jour de développement son expression devient confinée à la partie antérieure de la PD et à la PI (Pogoda, von der Hardt et al. 2006). Cette expression dynamique d'*ascl1a* suggère qu'elle est requise pour la spécification précoce de l'hypophyse ainsi que pour la différenciation terminale de certaines cellules endocrines de l'adénohypophyse plus tard. Les mutants *ascl1a* (ou *pia* pour "pituitary absent") n'expriment aucune hormone adénohypophysaire, de plus, l'expression de marqueurs de spécification *lim3* et *pitx3* est réduite et celle de *pit1* est complètement absente (Pogoda, von der Hardt et al. 2006). La plupart des cellules hypophysaires entrent en apoptose, les cellules survivantes sont de petites cellules rudimentaires *lim3* et *pitx3* positives, qui restent négatives pour l'expression d'hormones. Chez les mammifères, l'homologue du gène *ascl1a* n'a aucune fonction connue dans la formation de l'adénohypophyse (Pogoda, von der Hardt et al. 2006, Ruebel, Leontovich et al. 2006, Zhu, Zhang et al. 2006).

## 1.8 Les acteurs de différenciation cellulaire dans l'adénohypophyse

### 1.8.1 Delta/Notch :

La voie de signalisation Delta/ Notch est un processus de communication intercellulaire, reposant sur l'interaction du récepteur Notch avec son ligand Delta. Elle intervient dans de nombreux processus moléculaires en contrôlant la différenciation et la prolifération cellulaires.

Récemment, une étude a montré que des ligands de la famille Delta et certains récepteurs de la famille Notch sont exprimés selon une distribution "poivre et sel" entre 19 et 36hpf au sein de l'hypophyse en formation, semblable à celle des types cellulaires dans les différents sous-domaines (Dutta, Dietrich et al. 2008) (Fig. 7).

Des études utilisant un inhibiteur spécifique de la voie dans des embryons de type sauvage ou des embryons mutants *mib* (mind bomb) déficients dans la voie ont montré que la formation initiale de la placode antérieure pituitaire est indépendante de la signalisation Notch. Cependant, entre 14 et 16hpf, donc plusieurs heures avant que les premières cellules de l'AH commencent à se différencier, la signalisation Delta-Notch joue un rôle dans la spécification du destin différentiel dans les trois sous-domaines (Dutta, Dietrich et al. 2008). En effet, la perte de signalisation Notch mène à une augmentation du nombre de lactotropes et une perte de corticotropes dans la aPD, une augmentation

du nombre de thyrotropes au dépens des somatotropes dans la pPD et, finalement, à une diminution des mélanotropes dans la PI. Au contraire, l'activation constitutive de la voie Notch mène au résultat inverse. Ces observations suggèrent qu'il existe un phénomène d'inhibition latérale initié par Notch qui régule le nombre relatif des types cellulaires hormonaux dans les 3 sous-domaines de l'adénohypophyse (Dutta, Dietrich et al. 2008).

### 1.8.2 Pit1 :

Pit1 est un facteur de transcription de la famille POU-homeodomaine qui présente une expression et une fonction strictement limitées à l'AH. Ce facteur est le premier marqueur spécifique dans le développement AH. Chez le zebrafish, ses transcrits sont détectés dans la placode vers 19hpf, plusieurs heures avant l'activation transcriptionnelle des premiers gènes hormonaux; son expression persiste tout au long de la vie (Nica, Herzog et al. 2004). Chez la souris, Pit1 est exprimé relativement tard au cours du développement hypophysaire dans la région caudomédiale (E13.5).

L'étude du rôle de Pit1 a été facilitée par l'existence de mutants spontanés de souris et de patients humains dans lesquels le gène *Pit1* est muté, ce qui perturbe le développement hypophysaire et provoque une absence de différenciation de la lignée lacto-, thyro- et somatotrope (Li, Crenshaw et al. 1990, Pfaffle, DiMattia et al. 1992, Radovick, Nations et al. 1992, Tatsumi, Miyai et al. 1992). En effet, des études dans 2 modèles murins par inactivation spontanée de *Pit1* : - les souris Snell qui présentent une mutation spontanée de Pit1 (W261C) à l'origine d'une anomalie de liaison sur sa séquence cible et - les souris Jackson qui présentent un réarrangement chromosomique à l'origine d'un défaut d'expression du facteur de transcription, ont démontré qu'il existe un déficit de somatotropes, lactotropes et thyrotropes postnatal associé à une hypoplasie hypophysaire.

De manière similaire, les mutants zebrafish *pit1* ne présentent aucun de ces trois mêmes types de cellules AH, indiquant que la fonction de *pit1* est hautement conservée entre les différentes classes de vertébrés (Nica, Herzog et al. 2004). On observe également une expansion des lignées *pomc* et gonadotropes. L'adénohypophyse formée chez ces mutants est de taille normale et ne présente aucun signe d'apoptose, suggérant que chez le mutant *pit1*, la lignée Pit1 subit un changement de destinée en corticotropes, mélanotropes et gonadotropes. Par conséquent, lors du développement normal de l'hypophyse, Pit1 semble avoir un rôle activateur sur les lactotropes, somatotropes et thyrotropes, et un rôle répresseur sur les corticotropes, les mélanotropes et les gonadotropes; ce rôle semble assez bien conservé chez la souris, bien qu'aucun rôle répresseur de la ligne *Pomc* n'ait été décrit (Nica, Herzog et al. 2004).

### 1.8.3 Complexe *eya1/six1* :

Le facteur de transcription à homéodomaine Six1 et son modulateur, la protéine phosphatase Eya1, font partie d'un complexe transcriptionnel multi-protéique. Eya1 présente une activité tyrosine phosphatase qui convertit le complexe d'un répresseur transcriptionnel à un activateur (Li, Oghi et al. 2003) .

Chez le zebrafish, *eya1* et *six1* sont coexprimés dans toutes les cellules de l'adénohypophyse à partir des premiers stades de la pré-placode (10hpf) (Nica, Herzog et al. 2006). Les mutants *eya1* sont incapables d'initier l'expression hormonale des corticotropes, mélanotropes et gonadotropes, de ce fait *eya1* semble définir une lignée cellulaire complémentaire à celle dépendant de *pit1*. Cependant, Eya1 est également requis pour maintenir l'expression de *pit1*, comme le montre la perte progressive des thyrotropes et somatotropes dans les embryons mutants. De manière intéressante, l'expression de la prolactine par les lactotropes est maintenue, suggérant que *pit1* est seulement requis pour l'initiation de l'expression de *prl*, tandis que son maintien est indépendant de *pit1*. Les études sur la somatolactine ont démontré que son expression requiert les deux facteurs Pit1 et Eya1, les lignées Pit1 et Eya1 ne sont donc pas totalement complémentaires (Lopez, Nica et al. 2006).

Enfin, dans les mutants *eya1*, les cellules adénohypophysaires ne deviennent pas apoptotiques et l'adénohypophyse conserve une taille normale (Nica, Herzog et al. 2006) .

### 1.8.4 Lim3/Lhx3 :

Ce facteur fait partie de la classe des gènes homéobox LIM codant pour des facteurs de transcription importants pour la détermination et la spécification de lignées cellulaires. L'expression de *lim3* est spécifique dans plusieurs tissus : les moto-neurones et les inter-neurones de la moelle épinière et du rhombencéphale, la rétine, l'épiphyse et l'hypophyse où son expression persiste dans la glande adulte suggérant une fonction pour la maintenance des types de cellules hypophysaires antérieures.

Chez la souris, il est un des premiers facteurs à être exprimé dans l'hypophyse (dans la poche de Rathke) et son expression se poursuit dans les lobes antérieurs et intermédiaires jusqu'à l'âge adulte (Batch *et al.* 1995)(Zhadanov, Copeland et al. 1995). Le knock-out chez les souris *Lhx3* (l'orthologue murin de *lim3*) montre l'importance de ce facteur : la formation de la poche reste au stade rudimentaire et les lobes antérieurs et intermédiaires n'apparaissent pas, il n'existe pas de différenciation des lignées hypophysaires, les souris KO présentent par ailleurs une létalité néonatale (Sheng, Zhadanov et al. 1996).

Le gène *lim3* du poisson zèbre débute son expression à 18hpf dans la placode hypophysaire et continue dans l'hypophyse en formation jusqu'à au moins 3dpf; son expression est donc hautement conservée par rapport à ses homologues chez d'autres vertébrés. (Glasgow, Karavanov et al. 1997, Nica, Herzog et al. 2004). Ce profil d'expression très conservé suggère que les fonctions de Lim3/Lhx3 soient aussi semblables chez le zebrafish, quoiqu'aucune étude n'ait été réalisée à ce jour.

### 1.8.5 Gata2 :

Gata2 est un facteur de transcription de la famille doigt de zinc. Ces protéines contiennent deux motifs en doigts de zinc dans leurs parties carboxy-terminale et un domaine de transactivation N-terminal. Le motif en doigts de zinc de la partie C-terminale est important pour la liaison du facteur à sa séquence consensus. Le doigt de zinc N-terminal est essentiel pour assurer l'affinité du facteur avec l'ADN (Whyatt, deBoer et al. 1993). En outre, les facteurs GATA de vertébrés sont hautement conservés au niveau de leur séquence, leur profil d'expression et de leur fonction (Heicklen-Klein, McReynolds et al. 2005).

Le gène *Gata2* de souris est transcrit pendant le développement embryonnaire dans l'hypophyse antérieure (à partir de E10.5) et persiste jusqu'à la naissance et à l'âge adulte (Dasen and Rosenfeld 1999) (Suh, Gage et al. 2002). Il est présent en permanence dans les lignées exprimant la sous-unité  $\alpha$  des glycoprotéines (Gsu $\alpha$ ) (Dasen and Rosenfeld 1999), alors que son expression a été montrée dans les glandes surrénales, dans la thyroïde, les cellules placentaires, intestinales et du pancréas, ainsi que dans tous les niveaux de l'axe reproductif (LaVoie 2003) (Viger, Guittot et al. 2008).

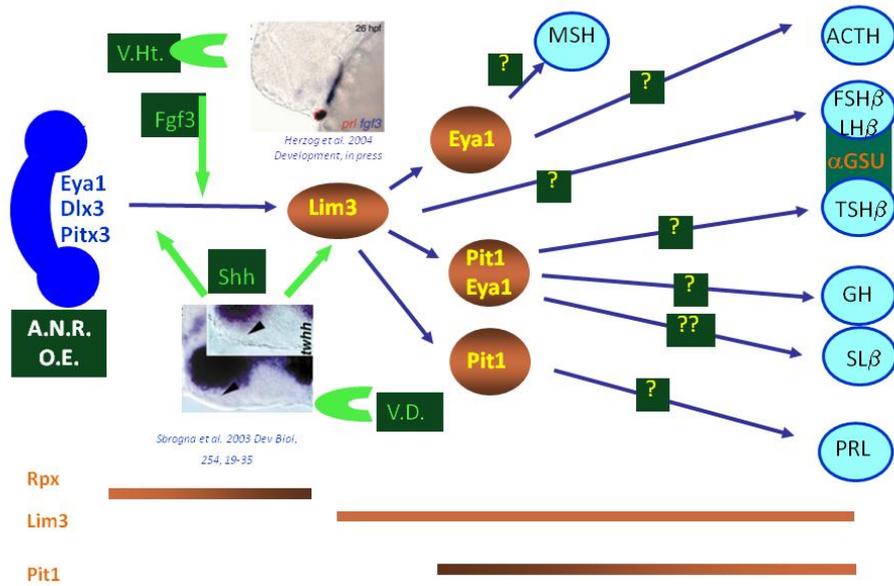
La fonction de Gata2 a été étudiée en détail dans le système hématopoïétique, où il est essentiel pour la prolifération et la survie des cellules souches (Zhou, Lim et al. 1998) (Tsai, Keller et al. 1994, Tsai and Orkin 1997, Shimizu and Yamamoto 2005). Gata2 a également été impliqué dans la régulation du développement urogénital (Zhou, Lim et al. 1998), la différenciation adipocytaire (Tong, Tsai et al. 2005), la transcription dans les cellules endothéliales différenciées (Han, Boyd et al. 2003, Minami, Murakami et al. 2004, Kanki, Kohro et al. 2011). Le rôle de Gata2 dépend du contexte; il peut soit bloquer les cellules dans un état précurseur (Tsai, Keller et al. 1994, Tsai and Orkin 1997), soit activer des gènes caractéristiques des cellules différenciées et maintenir la fonction de la cellule mature (Minami, Murakami et al. 2004).

La létalité précoce des embryons KO pour le gène *Gata2* chez la souris a longtemps limité les études de sa fonction spécifique dans l'hypophyse aux recherches sur cellules en culture. Ces études ont montré que Gata2 active ses gènes cibles spécifiques en se fixant sur leur promoteur, par contre, l'insuffisance de Gata2 semble augmenter le niveau de transcription des gènes pour les gonadotropines dans les cellules thyroïdiques. En fait, dans les thyroïdiques, Gata2 interagit avec Pit1. Deux cas peuvent alors se présenter : - les gènes spécifiques aux thyroïdiques présentent, au niveau du promoteur, un site de fixation pour Pit1 adjacent à celui pour Gata2, alors le dimère Pit1-Gata2 peut se lier à l'ADN et activer leur transcription, - par contre, s'il n'existe pas, au niveau du promoteur, un site de fixation Pit1 adjacent au site Gata2, ce dernier est incapable de se lier à l'ADN à cause de son interaction avec Pit1, et donc d'activer la transcription. C'est le cas des gènes spécifiques aux gonadotropes. C'est ainsi que les gènes spécifiques aux gonadotropes sont exprimés dans les gonadotropes et pas dans les thyroïdiques, et réciproquement (Dasen and Rosenfeld 1999, Suh, Gage et al. 2002). Plus récemment, dans des cellules primaires et une lignée gonadotrope de souris, des

chercheurs (Lo, Zheng et al. 2011) présentent un nouveau mécanisme moléculaire pour le facteur Gata2 dans l'hypophyse. En effet, il augmente l'activité du promoteur *Lhβ* en synergie avec le récepteur nucléaire orphelin SF1/LRH1.

Récemment a été créé un modèle conditionnel (Cre-lox) de souris KO pour *Gata2* tissu-spécifique dans l'hypophyse qui présente une diminution de la population des cellules thyrotropes à la naissance et des niveaux plus bas en Tshβ et Fshβ dans le sérum des souris adultes. En conséquence, *Gata2* semble être dispensable pour la spécification et le maintien des cellules gonadotropes et thyrotropes, mais très important pour leur fonction optimale (Charles, Saunders et al. 2006).

Dans le poisson zèbre, la transcription du gène homologue *gata2a* a été détectée dans l'ectoderme ventral (Detrich, Kieran et al. 1995) et, plus tard, dans les tissus hématopoïétiques et le système nerveux central (Meng, Tang et al. 1997, Penberthy, Zhao et al. 2004, Yang, Jiang et al. 2007). La fonction conservée dans l'hématopoïèse a aussi été montrée (Pase, Layton et al. 2009, Liu, Yao et al. 2012, Liu, Bhang et al. 2013, Wang, Zhu et al. 2014). Par contre, aucune fonction des facteurs *Gata2* n'a encore été étudiée dans le développement hypophysaire.



**Figure 8. Cascade moléculaire de la formation adenohipophysaire chez le zebrafish.**

Schéma de la cascade régulatrice hypophysaire chez le zebrafish qui présente des mécanismes semblables à la souris. L'hypophyse est dérivée de l'ectoderme oral et exprime des facteurs comme: Eya1, Dlx3, Pitx3 sous l'influence de signaux externes comme Fgf3 et Shh provenant du diencéphale ventral. Lim3 est le facteur pan-hypophysaire exprimé dans toutes les cellules pituitaires, d'autres facteurs spécifiques de certaines lignées comme : Pit1, Eya1-Six1, sont nécessaires pour sa formation. Cependant, il y a des lacunes dans notre connaissance notamment au niveau de la différenciation terminale des lignées cellulaires qui sont représentées par un point d'interrogation (?). O.E. : ectoderme oral, A.N.R: antérieur neural ridge.

## 2. Le poisson zèbre comme modèle animal

### 2.1 Généralités sur le zebrafish (*Danio rerio*)

Le poisson zèbre est un téléostéen de la famille de cyprinidés, originaire des eaux douces du Nord et du centre de l'Inde. Les attributs de cette espèce l'ont établi comme un modèle puissant pour l'étude du développement des vertébrés. L'accessibilité de ses embryons suite à la fécondation externe permet de nombreuses manipulations, leur transparence permet la visualisation directe d'une série de processus biologiques *in vivo* (Beis and Stainier 2006).

Ce petit téléostéen tropical présente en effet beaucoup d'avantages (Detrich, Kieran et al. 1995) :

- Un élevage aisé et un coût peu élevé; vu sa petite taille: on peut rassembler un grand nombre de poissons zèbre dans un petit espace.
- La fécondité est grande, chaque ponte d'une femelle mature donne en moyenne plusieurs centaines d'œufs.
- Un temps de génération court : les poissons atteignent la maturité sexuelle après 3 à 4 mois.
- Un cycle de développement court, ce qui rend facile l'observation des structures essentielles du corps sans dissection, qui se mettent en place pendant les 24-48 premières heures pendant lesquelles les embryons sont transparents.
- Un génome presque entièrement séquencé et libre d'accès.
- Un nombre important de mutants décrits.
- Les œufs ont une taille qui rend les micromanipulations possibles et aisées ; microinjections pour des applications telles que la transgénèse, le « knock-down » ou la surexpression de gènes etc.

### 2.2 Développement du zebrafish

Charles Kimmel a décrit avec précision les différentes étapes de l'embryogenèse chez le zebrafish (Kimmel, Ballard et al. 1995).

Sept étapes ont été mises en évidence :

Zygote : 0-45 min

Le clivage : 0.7-2.2 hpf

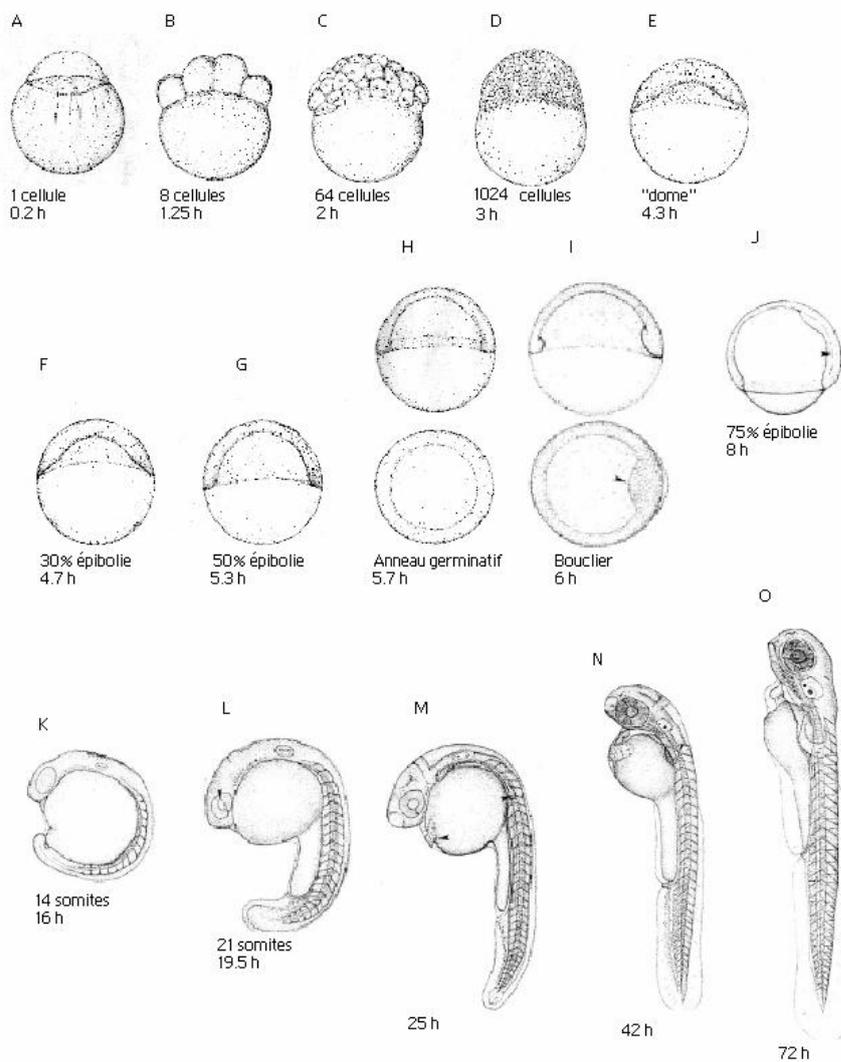
La blastula : 2.25-5.25 hpf

La gastrula : 5.25-10 hpf

La période de segmentation : 10-24 hpf

La pharyngula : 24-48 hpf

L'éclosion : 48-72 hpf



**Figure 9. Développement embryonnaire du zebrafish.** (A) Le blastodisque du zygote se situe sur le vitellus, au niveau du pôle animal. (B, C) L'étape de clivage consiste en 6 divisions synchrones produisant 64 blastomères au pôle animal. (D-G) A la transition mi-blastuléenne, les divisions deviennent asynchrones. Le mouvement d'épibolie débute et la blastula devient gastrula à 50% du mouvement accompli. (H-K) En achevant son épibolie, la gastrula subit les mouvements d'involution (formation de l'anneau germinatif), de convergence (formation du bouclier par accumulation de cellules au niveau dorsal) et d'extension pour ensuite entrer dans l'étape de segmentation. (K, L) Etape de segmentation: les premiers organes se forment ainsi que les somites et le cerveau. (M, N) Stade pharyngula : la circulation sanguine se met en place, les nageoires se forment et les pigments apparaissent. (O) Les cartilages crâniofaciaux et de la ceinture pectorale se forment ainsi que la vessie natatoire. L'embryon est fonctionnel et la recherche de nourriture débute. (Kimmel, Ballard et al. 1995).

Une fois fécondé, l'œuf est appelé zygote. Il va essentiellement subir des mouvements cytoplasmiques. Très vite (45 min après la fécondation), la cellule qui est apparue au pôle animal de l'œuf commence à se diviser. Cette étape est appelée période de clivage. Une fois que les cellules (appelés blastomères) forment un amas au-dessus du sac vitellin, l'embryon se trouve dans le période de blastula. A ce stade, deux événements importants se produisent : le transition mi-blastuléenne (mid blastula transition, MBT) et le début de l'épibolie.

La transition mi-blastuléenne consiste en l'activation des gènes zygotiques, avant cette étape les ARN présents dans l'embryon sont d'origine maternelle. L'épibolie, quant à elle, résulte du mouvement des blastomères qui vont former un tissu, le blastoderme. Celui-ci s'étend autour du jaune pour finalement le recouvrir. Ce mouvement morphogène se poursuit dans le période de gastrula. Ce stade est caractérisé par le repliement du blastoderme sur lui-même, formant ainsi deux couches de tissus superposées: l'épiblaste, la couche supérieure qui formera l'ectoderme, et l'hypoblaste, la couche inférieure qui donnera lieu au mésendoderme (ce tissu correspond au mésoderme et à l'endoderme, généralement distincts dans les autres modèles animaux), ce mésendoderme migre antérieurement le long de la ligne médiane (sa partie antérieure portant le nom de plaque prechordale) et donne naissance à différentes structures, comme par exemple la notochorde. Le mésoderme axial va induire l'épiblaste situé juste au-dessus de lui : celui-ci s'épaissit et forme ainsi la plaque neurale qui s'étend le long de l'embryon (Fig 9.), cette dernière s'invagine pour former un tube neural qui s'élargit antérieurement pour former le cerveau et qui évoluera le long du corps en moelle épinière.

Au stade de 10 heures après fécondation, l'embryon commence à se segmenter. L'embryon s'allonge et les somites (qui forment les muscles et le sclérotome, précurseur du cartilage vertébral) apparaissent le long du corps. Dans le cerveau, les neuromères se développent pour former les différentes parties du cerveau antérieur (forebrain), le télencéphale et le diencéphale, ainsi que le mésencéphale (midbrain). Sept rhombomères apparaissent à l'arrière du cerveau antérieur qui subdivisent ainsi la partie postérieure de celui-ci (hindbrain)(Fig 9.). Au cours de cette segmentation, d'autres événements vont se produire, comme la migration de crêtes neurales, la différenciation des premiers neurones, l'organogenèse des reins, ...

24 heures après la fécondation, l'embryon entre dans la période pharyngula, moment du développement où les morphologies des embryons des différents vertébrés sont comparables. Cette période dure environ 20 heures pendant lesquelles les nageoires commencent à apparaître, le système circulatoire se met en place, les cellules pigmentées se différencient.

La morphogenèse des mâchoires et le développement des nageoires ont lieu entre 48 et 72hpf (période d'éclosion). L'animal porte le nom d'embryon jusqu'à la fin du troisième jour après fécondation ; au quatrième jour, la larve est autonome tant au niveau de la nage que de la prise de nourriture. La larve continue ensuite sa croissance (la larve a accompli l'essentiel de sa morphogenèse) jusqu'à atteindre le stade juvénile à 30dpf et deviendra adulte à 90dpf. A ce moment la procréation sera possible (Kimmel, Ballard et al. 1995, Nusslein-Volhard 2002).

## 3. La famille des facteurs SOX

### 3.1 Généralités

Les protéines SOX appartiennent à la superfamille des protéines à domaine HMG (High Mobility Group) et sont des facteurs de transcription très conservés au cours de l'évolution. La sous-famille des facteurs SOX réunit les protéines dont le domaine HMG comporte plus de 50% de similarité avec celui du facteur de détermination du sexe SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome), d'où le nom SOX pour SRY-box.

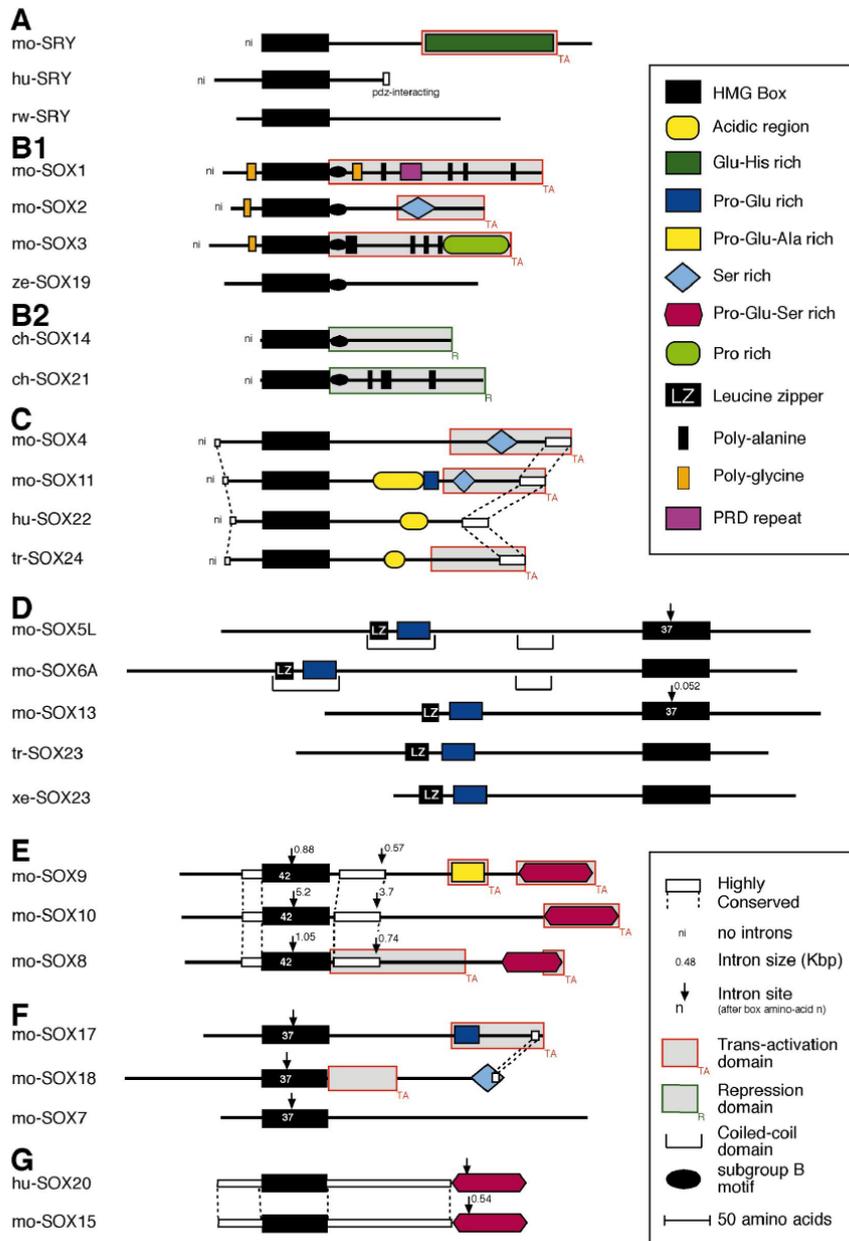
Le domaine HMG confère aux protéines SOX la capacité de se lier à l'ADN au niveau d'une séquence consensus heptamérique. Cette fixation induit une courbure de l'ADN, ce qui a amené l'hypothèse que les protéines SOX pourraient exercer une fonction de protéines architecturales en organisant localement la chromatine de façon à permettre l'association d'autres facteurs de transcription eux-mêmes liés à l'ADN et ainsi assembler des complexes protéiques biologiquement actifs. En effet, une même protéine SOX est dans la plupart des cas exprimée dans différents tissus. Cependant, dans chacun des tissus où elle est exprimée, elle régule l'expression de gènes différents afin d'induire la spécification des cellules vers une voie donnée. Comment expliquer qu'une même protéine ait une action différente selon le lignage où elle est exprimée, alors qu'elle reconnaît un site consensus nucléotidique présent en des milliers de copies sur le génome. L'étude fonctionnelle et moléculaire de plusieurs facteurs SOX a amené la suggestion que les SOX acquièrent leur spécificité en interagissant avec des protéines partenaires qui sont le plus souvent également des facteurs de transcription (Kamachi, Uchikawa et al. 2000, Wilson and Koopman 2002, Kamachi and Kondoh 2013)

### 3.2 Classification

Cette superfamille de protéines se divise en deux grandes familles : la famille TCF/SOX/MATA, composée de protéines qui ne possèdent qu'un seul domaine HMG, ont un profil d'expression restreint et se lient à l'ADN en reconnaissant une séquence spécifique; et la famille HMG/UBF, dont les protéines possèdent plusieurs domaines HMG, ont une expression ubiquitaire et sont moins spécifiques dans leur liaison à l'ADN.

Peu d'acides aminés sont conservés entre les boîtes HMG des membres de la superfamille à domaine HMG. Par contre, au sein de chaque sous-famille il existe une forte conservation du domaine HMG (Laudet, Stehelin et al. 1993, Soullier, Jay et al. 1999). La classification prend en compte l'homologie de la boîte HMG avec celle de SRY, mais également entre les différents membres de la famille. Les gènes SOX ont à l'origine été identifiés par PCR à partir du domaine HMG et ont été numérotés dans

l'ordre de leur identification dans les différentes espèces, ce qui a engendré de nombreuses confusions et l'attribution de plusieurs noms à des séquences correspondant au même gène. Après de nombreux recoupements et alignements de séquence, des études de phylogénie et une réattribution de noms, une classification définitive semble avoir été établie (Bowles, Schepers et al. 2000); (Schepers, Teasdale et al. 2002). La famille TCF/SOX/MATA compte actuellement 20 membres chez l'homme et la souris, incluant SRY. Elle est subdivisée en 8 groupes (A à H, le groupe A étant réservé à SRY), en fonction des homologies entre les différents membres au niveau et en dehors de la boîte HMG (Schepers, Teasdale et al. 2002). Ainsi, par exemple, les facteurs de transcription SOX4 sont, avec les facteurs SOX11, SOX22 et SOX24, les membres du groupe C de la famille SOX (Fig. 10).

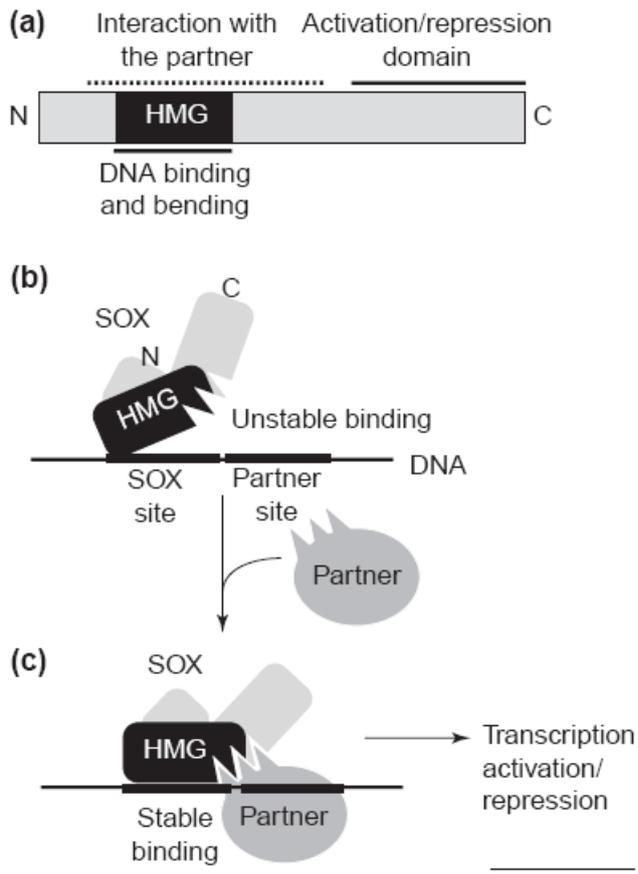


**Figure 10. Représentation schématique de la famille des protéines SOX** mettant en évidence la conservation de différents groupes familiaux SOX. Les protéines sont disposées en groupes par homologie de séquence de leur domaine HMG. Diverses caractéristiques structurales, des motifs et des régions fonctionnelles (démonstrées ou supposées) sont représentées ainsi que les positions et les tailles d'introns connues. « ni » (pas d'intron) (Bowles, Schepers et al. 2000) .

### 3.3 Propriétés

Les protéines SOX sont capables de lier l'ADN via leur domaine HMG, et ce de façon spécifique : le motif consensus reconnu par ces facteurs est une séquence heptamérique de type 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3'. Le domaine HMG est constitué de trois hélices alpha organisées en forme de L, maintenues par un cœur hydrophobe. Les protéines SOX se fixent au niveau du petit sillon de l'ADN et cette fixation induit une courbure de l'ADN de façon à ce que celui-ci s'adapte à la forme concave du domaine HMG. En conséquence, la fixation des protéines SOX ou de SRY induit un angle de courbure moyen de 70 à 85° de l'ADN, un élargissement du petit sillon et une déformation de l'hélice par rapport à la forme B de l'ADN (Wegner 1999).

L'étude fonctionnelle de plusieurs protéines SOX a par ailleurs permis de montrer que certaines d'entre elles exercent également un rôle de facteur de transcription classique, en se liant au niveau du promoteur de certains gènes et en régulant l'expression de ceux-ci. Cette régulation peut être négative ou positive, des domaines de transactivation et de répression ayant été identifiés chez les différents membres de la famille SOX (figure 6). La fonction des protéines SOX serait donc double, à la fois facteurs de transcription et protéines architecturales de la chromatine.



**Figure 11. Modèle d'interaction du facteur SOX avec son partenaire**

(a) Une protéine typique SOX dispose de trois domaines fonctionnels: un domaine HMG qui interagit avec l'ADN, un domaine d'activation ou un domaine de répression généralement à proximité de l'extrémité C-terminale, et une région qui peut inclure l'interaction d'une partie du domaine HMG avec un facteur partenaire.

(b) La protéine SOX se fixe à son site de liaison via son domaine HMG seul, la liaison est probablement instable.

(c) Lorsque le facteur partenaire interagit avec le facteur SOX et se lie au site d'ADN à proximité du site SOX, la liaison sera stabilisée et le complexe permettra l'activation ou la répression de l'expression du gène cible (Kawachi et al. 2000).

### 3.4 Les fonctions des protéines SOX :

Les différents membres de la famille SOX sont impliqués dans diverses pathologies humaines. Certains facteurs SOX sont exprimés très précocement au cours du développement. Ils présentent des profils d'expression divers, dynamiques au cours de l'embryogenèse et, pour certains, l'expression est maintenue dans divers tissus chez l'adulte. Pratiquement tous les tissus embryonnaires expriment au moins un gène SOX à au moins un stade et il n'est pas rare que plusieurs SOX soient exprimés dans le même tissu et au même stade. L'expression précoce et dynamique des protéines SOX, ainsi que l'étude fonctionnelle de certains d'entre eux, a depuis longtemps suggéré que ces facteurs sont impliqués dans la spécification précoce du devenir cellulaire (Wegner 1999). Cependant, l'expression concomitante de plusieurs SOX dans le même tissu, associée au fait que les protéines SOX sont exprimées dans plusieurs tissus différents et reconnaissent le même site de fixation sur l'ADN, a posé la question d'une part de la spécificité, et d'autre part de la possible redondance des facteurs SOX. Ils jouent un rôle essentiel dans divers processus du développement: maintenance de la pluripotence et détermination du destin cellulaire, neurogenèse, développement sexuel, la chondrogenèse et l'hématopoïèse (Pevny and Lovell-Badge 1997, Kiefer 2007, Lefebvre, Dumitriu et al. 2007).

### 3.5 Les facteurs SOX dans le développement hypophysaire.

La famille des facteurs de transcription Sox est émergente dans le rôle d'acteurs majeurs contrôlant les étapes précoces du développement hypophysaire (Alatzoglou, Kelberman et al. 2009). Notamment Sox2 et Sox3 apparaissent comme des acteurs clés qui contrôlent les premiers stades du développement hypophysaire et qui sont largement exprimés pendant le développement du système nerveux central. Ces facteurs jouent un rôle important dans la morphogenèse de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Pendant le développement hypophysaire, Sox2 est exprimé dans le diencéphale et la poche de Rathke alors que Sox3 est exprimé dans le diencéphale et l'infundibulum, suggérant que leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect.

#### 3.5.1 Sox2

Le facteur Sox2, dérivant d'un gène comportant un exon unique, appartient au sous-groupe SOXB1 et est exprimé chez la souris dans le système nerveux central en développement, ainsi que dans les placodes sensorielles, les arcs branchiaux, l'oreille interne, l'endoderme intestinal, y compris l'œsophage et la trachée (Collignon, Sockanathan et al. 1996, Wood and Episkopou 1999, Williamson, Hever et al. 2006, Hume, Bratt et al. 2007). Chez la souris, l'expression de *Sox2* est détectée avant la gastrulation (Avilion, Nicolis et al. 2003). Après l'implantation, l'expression de *Sox2* se restreint à

l'ectoderme antérieur présomptif ; à 11.5dpc, *Sox2* est exprimé de manière uniforme dans la poche de Rathke (Kelberman, Rizzoti et al. 2006) et à 18.5dpc l'expression de *Sox2* est détectée dans la zone dorsale de l'hypophyse antérieure.

Dans l'hypophyse adulte, l'expression de *Sox2* est maintenue dans une petite population de cellules, en alignement dans l'hypophyse ou dispersées dans le parenchyme, qui maintiennent leur potentiel de différenciation pour tout type de cellule pituitaire, représentant dès lors des cellules progénitrices (Fauquier, Rizzoti et al. 2008). Cette persistance de son expression dans l'hypophyse adulte pourrait être cruciale pour la plasticité et la réponse dynamique de la glande aux exigences fluctuantes du système endocrinien, sa capacité à se régénérer après un traumatisme ou même pour expliquer le potentiel de formation de tumeurs (Vankelecom 2007, Fauquier, Rizzoti et al. 2008).

Ces observations suggèrent que *Sox2* joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire dans les progéniteurs précoces au cours du développement, le pool de cellules précurseurs indifférenciées serait insuffisant chez les mutants pour permettre la différenciation d'un nombre suffisant de cellules productrices d'hormones, entraînant une grave hypoplasie hypophysaire. (Kelberman, Rizzoti et al. 2006, Kelberman, de Castro et al. 2008, Alatzoglou, Kelberman et al. 2009). Le rôle essentiel de *Sox2* dans le développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire a été confirmé chez l'homme par des études d'expression dans des embryons de 5-9 semaines de développement (Kelberman, de Castro et al. 2008). Les patients humains porteurs de mutations hétérozygotes *SOX2* présentent un phénotype caractérisé par un hypoplasie de l'hypophyse antérieure (Fantes, Ragge et al. 2003, Williamson, Hever et al. 2006, Kelberman and Dattani 2008), les hormones hypophysaires sont détectées à des concentrations normales à l'exception d'un déficit de l'expression de GH et occasionnellement des concentrations anormales de FSH et LH (Kelberman, Rizzoti et al. 2009) (Seuntjens, Vankelecom et al. 1999) (Bouligand, Ghervan et al. 2009) (Pitteloud, Thambundit et al. 2009). D'une autre côté, (Sato, Kamachi et al. 2007) présentent une patiente féminine avec une mutation hétérozygote touchant le domaine HMG de *SOX2*, cette patiente souffre d'un hypogonadisme hypogonadotrope isolé mais son hypophyse antérieure est normale. Récemment, Jayakodi *et al.* 2012 présentent deux autres patients caractérisés par une insuffisance du facteur *SOX2* associée à un hypogonadisme hypogonadotrophique et propose que cette maladie est due à un déficit de stimulation hypothalamique des gonadotropines (GnRH) et non à l'absence de la différenciation des gonadotropes. La carence en gonadotropines sans hypoplasie de l'hypophyse antérieure suggère que *SOX2* pourrait être impliqué de façon indépendante à plusieurs niveaux pendant le développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui est compatible avec son expression non uniforme dans l'hypothalamus.

Chez le zebrafish, la fonction de ce facteur dans la différenciation des cellules hypophysaires n'est pas encore connue.

### 3.5.2 Sox3

*Sox3* est un gène comportant un unique exon situé sur le chromosome X chez tous les mammifères. Son expression est détectée tôt dans le développement, au stade de 6.5dpc chez la souris (avant l'apparition de la ligne primitive). Par contre, son expression n'est jamais détectée au sein de la poche de Rathke (Rizzoti, Brunelli et al. 2004). En effet, il est exprimé dans le système nerveux central, mais surtout dans le diencephale ventral et dans l'infundibulum, où il est nécessaire pour la morphogénèse correcte de la poche de Rathke (Solomon, Ross et al. 2004).

Le rôle de *Sox3* dans le développement de l'hypophyse a été examiné par (Rizzoti, Brunelli et al. 2004) chez les souris mutantes qui ne montrent pas de létalité embryonnaire et sont nées avec le sexe attendu, suggérant que *Sox3* n'est pas nécessaire pour la détermination du sexe, mais elles présentent un phénotype variable en termes de réduction de taille et de fertilité. Un tiers des males mutés étaient normaux, mais les plus gravement atteints présentent une faible croissance ainsi qu'une faiblesse généralisée; ils ne survivent pas longtemps à la mutation (Camper 2004). Ils ont également montré des défauts crânio-faciaux, y compris au niveau de la prolifération des dents, ce qui entraîne une malformation et un mauvais alignement de la mâchoire (Rizzoti and Lovell-Badge 2007).

Le déficit endocrinien des mutants était variable et corrélé avec leur poids. La concentration de Gh était presque trois fois inférieure à celle du type sauvage, celle des Lh, Fsh et Tsh était réduite à deux mois d'âge post-natal. Dans les examens histologiques, le mutant *Sox3* présentait une hypoplasie du lobe antérieur de l'hypophyse avec une distinction perturbée entre les lobes antérieurs et intermédiaires, ainsi que des défauts du cerveau moyen à la naissance des souris qui sont les plus affectées. Les mutants *Sox3* présentent une morphologie aplatie du diencephale ventral et une expansion transitoire des domaines d'expression de *Bmp4* et *Fgf8* (Rizzoti, Brunelli et al. 2004). L'atténuation de la signalisation BMP lors de l'induction hypophysaire normale est importante pour le maintien de l'équilibre des facteurs de signalisation, cette mutation pourrait provoquer de multiples invaginations de la poche (Davis and Camper 2007). Tous ces résultats suggèrent que SOX3 est essentiel pour la formation et la morphogénèse de l'infundibulum et de l'hypothalamus et est impliquée indirectement dans la formation de la Poche de Rathke en stimulant la croissance de l'infundibulum et en restreignant les domaines de signalisation BMP et FGF.

Chez l'homme, l'analyse des mutations de *SOX3* a fourni des preuves convaincantes que le développement normal du diencephale, infundibulum et de l'hypophyse antérieure est sensible au dosage de SOX3. En effet, un surdosage de *SOX3* a été identifié dans des pédigrées d'hypopituitarisme accompagné d'un retard mental (Hamel, Smits et al. 1996, Lagerstrom-Fermer, Sundvall et al. 1997, Hol, Schepens et al. 2000, Solomon, Nouri et al. 2002, Solomon, Ross et al. 2004, Woods, Cundall et al. 2005).

Chez le zebrafish, aussi bien le knock-down que le gain de fonction de ce facteur conduisent à une perte de structures neurales, ainsi qu'à l'expansion du neuroépithélium; en conséquence, *Sox3* est

essentiel pour la différenciation neuronale tardive dans les systèmes nerveux central et périphérique (Dee, Hirst et al. 2008).

### 3.5.3 SOX4 (SRY-like HMG-box4)

Facteur de transcription qui dérive d'un gène à exon unique, Sox4 appartient au groupe C des facteurs de transcription SOX et est hautement conservé à travers l'évolution des vertébrés (Bowles, Schepers et al. 2000). Le facteur SOX4 humain a 474aa. Il dispose de deux domaines fonctionnels : une boîte HMG de type Sry (Sox), domaine de liaison à l'ADN et situé dans la moitié N-terminale de la protéine, et un domaine de transactivation (TAD), situé à l'extrémité C-terminale (Dy, Penzo-Mendez et al. 2008).

Au cours de l'embryogenèse, Sox4 est essentiel pour le développement normal cardiaque chez la souris. Une mutation homozygote *Sox4* produit une défaillance dans le développement de la crête endocardiaque, ce qui empêche la formation adéquate des valves semi-lunaires et entraîne une défaillance circulatoire (Schilham, Oosterwegel et al. 1996). De plus, elle provoque un défaut dans le développement des lymphocytes et leur différenciation (Busslinger 2004, Hong and Saint-Jeannet 2005, Perl, Kist et al. 2005). Un rôle critique a aussi été montré pour Sox4 dans la survie et la différenciation de nombreuses autres lignées de cellules pendant le développement embryonnaire et la vie postnatale. Il semble agir en grande partie en redondance avec les membres proches du groupe C : Sox11 et Sox12 (Pramoongjago, Baras et al. 2006, Nissen-Meyer, Jemtland et al. 2007, Potzner, Griffel et al. 2007, Bhattaram, Penzo-Mendez et al. 2010, Thein, Thalhammer et al. 2010).

D'autres études ont investigué la fonction de *Sox4* dans le développement de divers organes comprenant : le CNS, le poumon, les bourgeons des dents et les gonades (Schilham, Oosterwegel et al. 1996, Wegner 1999). Elles ont révélé que *Sox4* est associé au carcinome du côlon et son expression a été impliquée dans la régulation de certaines tyrosines kinases. Par ailleurs, des études ont montré que *Sox4* est fortement exprimé dans plusieurs tumeurs comprenant le cancer du sein (Graham, Hunt et al. 1999, Zhang, Liang et al. 2012) ; le carcinome hépatocellulaire, médulloblastome et le cancer de poumon (McCracken, Kim et al. 1997, Ahn, Cho et al. 1999, Lee, Appleby et al. 2002, Dong, Wilhelm et al. 2004, Hur, Rhim et al. 2010) suggérant que *Sox4* pourrait être impliqué dans leur tumorigenèse.

### 3.5.4 Sox4 et pancréas

L'implication du facteur Sox4 dans le développement du pancréas a été démontrée chez le zebrafish (Mavropoulos, Devos et al. 2005) et la souris (Wilson, Yang et al. 2005). Chez la souris, l'expression de *Sox4* dans le pancréas a été confirmée par hybridation *in situ*, son mRNA a été trouvé largement dans les bourgeons pancréatiques précoces et dans toutes les cellules des îlots pancréatiques chez les souris adultes (Wilson, Yang et al. 2005).

Deux gènes orthologues à *Sox4* de mammifères sont présents dans le zebrafish, en raison d'une duplication ancestrale de son génome : *sox4a* et *sox4b*, seul l'un d'entre eux est fortement exprimé dans l'ébauche du pancréas, *sox4b*. Chez le poisson zèbre, *sox4b* est un marqueur très précoce exprimé de façon transitoire lors de la différenciation des cellules endocrines et joue un rôle crucial dans la génération de cellules endocrines alpha, produisant le glucagon. En effet, le knock-down de *sox4b* affecte la différenciation des cellules productrices de glucagon, entraînant une réduction drastique de l'expression du glucagon, tandis que d'autres marqueurs du pancréas comme l'insuline, la somatostatine et la trypsine ne sont pas affectés de manière significative (Mavropoulos, Devos et al. 2005). Par contre, *sox4a* intervient dans la neurogenèse sous le contrôle de la signalisation Wnt (Gribble, Kim et al. 2009).

### 3.5.5 SOX4 et l'hématopoïèse

Le développement des cellules B nécessite une orchestration précise d'un réseau de gènes régulateurs impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation (Hardy and Hayakawa 2001, Nagasawa 2006). En particulier au début, où plusieurs facteurs de transcription essentiels doivent agir dans un ordre hiérarchique pour contrôler précisément l'expression des gènes primordiaux dans le développement des cellules B (Busslinger 2004, Fuxa and Skok 2007). Le facteur Sox4 apparaît fortement impliqué dans la formation des cellules sanguines, en effet à l'âge adulte son expression se limite aux précurseurs des lymphocytes T et B. L'inactivation du gène dans des embryons de souris Sox4<sup>-/-</sup> entraîne leur décès vers les jours E14, par une anomalie de développement du myocarde (Ya, Schilham et al. 1998) D'autres travaux présentent Sox4 dans la voie de transduction de interleukine IL5, connue pour son rôle dans la différenciation des éosinophiles, mais aussi pour le contrôle de certaines étapes de différenciation des lymphocytes B. Il est apparu que la chaîne  $\alpha$  du récepteur IL5R lie spécifiquement l'IL5 et interagit avec la synténine. D'autre part, la synténine interagit avec Sox4 dans les cellules pre-B pour activer ensemble leurs gènes cible. Il apparaît donc que l'induction de la différenciation des lymphocytes B par l'IL5 passe par l'activation de gènes spécifiques *via* Sox4 en collaboration avec la synténine (Geijsen, Uings et al. 2001).

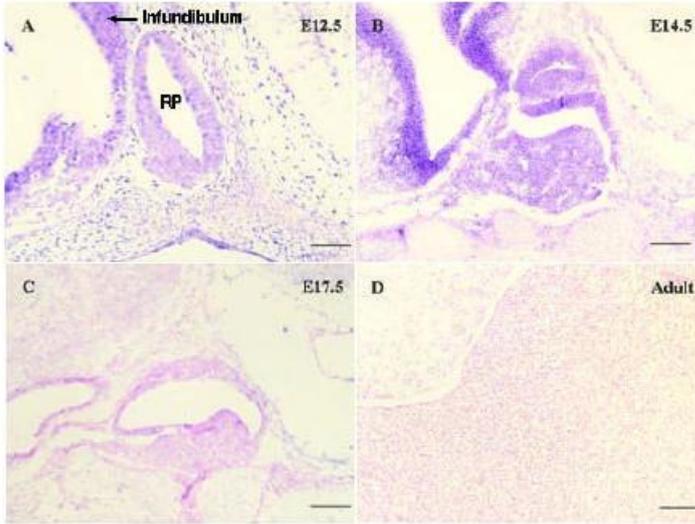
Divers résultats obtenus par culture de cellules *in vitro* indiquent que Sox4 est indispensable pour le développement des lymphocytes B dans le foie fœtal. Une carence de Sox4 provoque l'arrêt de la formation de cellules B pendant le développement du fœtus. Des études récentes, dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC) ont montré que Sox4 favorise la survie au cours du développement des cellules B; utilisant un knock-out conditionnel du gène *Sox4* elles ont révélé l'élimination presque entière des cellules pro-B dans les foies fœtaux et dans la moelle osseuse adulte, résultant en un déficit

sévère des cellules pro-B ainsi que plus tard des cellules B matures, associé à une augmentation de la fréquence de l'apoptose (Sun, Mallampati et al. 2013).

### 3.5.6 Sox4 dans l'hypophyse humaine

Récemment (Ma, Qi et al. 2009) ont observé des transcrits de *SOX4* parmi les ARNm extraits de l'hypophyse fœtale humaine, notant en outre que leur abondance est plus élevée dans l'hypophyse fœtale que dans l'adulte. L'expression de *Sox4* a aussi été examinée en souris par hybridation *in situ* et on a observé son expression dans l'infundibulum et la poche de Rathke (Fig.12). Vers E12.5, *Sox4* était exprimé à des niveaux modestes dans l'infundibulum et la RP (Fig 12). A E14.5, l'expression de *Sox4* était la plus abondante dans les cellules indifférenciées des lobes antérieur, intermédiaire et postérieur (Fig12), alors qu'elle a diminuée de manière significative à E17.5 (Fig.12.). Chez les souris adultes, l'hypophyse est entièrement différenciée et contient toutes les lignées de cellules sécrétant des hormones, par contre aucun ARNm *Sox4* n'a été détecté ni dans la partie antérieure, intermédiaire ou les lobes postérieurs (Fig.12).

L'approche de transcriptomique de cette étude indique quelques nouvelles pistes en matière de développement de l'hypophyse humaine et a révélé, pour la première fois, la présence de *SOX4* comme un des ARNm les plus abondants dans l'hypophyse fœtale.



**Figure. 12. Hybridation *in situ* de Sox4 dans les hypophyses fœtales chez la souris.**

A-D montrent les images hybridées avec la sonde *Sox4*. La couleur bleue a été initiée par la phosphatase alcaline et BCIP/NBT. Toutes les lames ont été contre-colorées avec 0,1% de rouge nucléaire après l'hybridation *in situ*. Grossissement x 200 (Bar = 50  $\mu$ m) (Ma, Qi et al. 2009).

## 4. Objectifs du travail

Notre but était de caractériser le développement de l'hypophyse en utilisant comme modèle le poisson zébre.

Les travaux présentés dans cette thèse ont donc porté sur plusieurs aspects:

- identifier de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans le développement hypophysaire
- Expression et rôle du facteur de transcription de la famille HMG *sox4b*, ce qui nous a permis de déterminer et détailler les fonctions de ces facteurs et d'autres comme *gata2a* au cours du développement hypophysaire, et
- Finalement, nous nous sommes intéressés d'analyser de manière plus fine le profil d'expression de l'hormone lutéinisante (*lhβ*) au cours du développement chez le zebrafish par hybridation *in situ*.

## II. Résultats :

### 2.1 Les Hormones Gonadotropines :

Les gonadotropines sont des glycoprotéines complexes qui regroupent deux hormones : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Ces deux hormones jouent un rôle fondamental dans tous les aspects du développement et du fonctionnement des gonades et sont secrétées chez tous les vertébrés par l'adénohypophyse (Gharib, Wierman et al. 1990, Swanson 2003).

De nombreux rapports ont été publiés sur la FSH et la LH chez les téléostéens. Les gonadotropines sont formées de deux sous-unités glycoprotéiques: une sous-unité commune  $\alpha$  qui est liée spécifiquement et fortement, mais pas de manière covalente à la sous-unité  $\beta$ , laquelle détermine l'activité biologique et la spécificité de l'hormone (Levavi-Sivan, Bogerd et al. 2010). La sous-unité alpha (C $\alpha$  ou G $\alpha$ ) gonadotropine est hautement conservée parmi les téléostéens et les tétrapodes. L'hormone lutéinisante (LH) joue un rôle important dans la reproduction des vertébrés. La configuration exon-intron du gène *lh $\beta$*  du poisson zèbre (trois exons et deux introns) est similaire à celle des mammifères, mais les séquences de la région promotrice *lh $\beta$*  de poisson zèbre ne sont pas conservées (Chen and Chiou 2010).

L'expression et la sécrétion des gonadotropines (FSH et LH) sont régies par une multitude de facteurs neuroendocrines produits par l'hypothalamus. Il est connu depuis plus de deux décennies qu'un facteur hypothalamique, la GnRH, stimule la synthèse et la sécrétion des gonadotropines par l'hypophyse antérieure (Topilko, Schneider-Maunoury et al. 1998). La localisation spatiale de l'expression des différentes sous-unités dans la glande hypophysaire a été étudiée chez le zebrafish adulte (So, Kwok et al. 2005) (Fig.13). Cette étude a clairement démontré l'expression et la distribution des ARNm *fsh $\beta$*  et *lh $\beta$*  dans deux populations distinctes de cellules gonadotropes dans l'hypophyse, alors que l'ARNm *gsu $\alpha$*  a été détecté dans toutes les zones où *fsh $\beta$*  ou *lh $\beta$*  a été localisé. Ces résultats sont en accord avec de nombreux autres rapports réalisés dans d'autres espèces de poisson par des analyses d'hybridation *in situ*. D'un autre côté, il a été difficile de produire des anticorps dirigés spécifiquement contre la Fsh ou la Lh en raison de la similarité structurelle entre les deux hormones. A ce jour, aucun sérum spécifique n'a été obtenu contre la Fsh de cyprinidés, il est donc impossible de distinguer les deux cellules productrices d'hormones par immunomarquage dans cette famille de téléostéens.

Des analyses par RT-PCR, très sensibles, dans le zebrafish adulte ont clairement démontré que les sous-unités des gonadotropines sont également exprimées dans une variété de tissus extra-hypophysaires : les gonades, le cerveau, les reins et le foie, à des niveaux d'expression évidemment inférieurs à ceux de l'hypophyse (Goldsmith, McGregor et al. 1983) (Markkula, Kananen et al. 1996) (Markkula, Hamalainen et al. 1995) (Zhang, Markkula et al. 1995). Chez les téléostéens, l'expression

de Fsh $\beta$  et Lh $\beta$  a été démontrée dans le cerveau de tilapia (*Oreochromis niloticus*) à la fois par RT-PCR et coloration immunocytochimique (Parhar, Ogawa et al. 2003). De même, une étude récente chez la dorade royale (*Sparus aurata*) a montré par des analyses d'hybridation Northern et RT-PCR que les gonadotropines sont exprimées dans l'ovaire et leur expression a été localisée à l'ovocyte par hybridation *in situ* et par immunocytochimie (Wong, Gothilf et al. 2004). Un phénomène similaire d'expression extra-hypophysaire/placentaire des gonadotropines a également été rapporté chez les mammifères, y compris l'homme (Goldsmith, McGregor et al. 1983) (Markkula and Huhtaniemi 1996). Ces résultats suggèrent que l'expression extra-hypophysaire des gonadotropines serait un phénomène universel chez les vertébrés, du moins au stade adulte.

Au sein de l'hypophyse, des études précédentes réalisées dans de nombreux téléostéens ont montré que les cellules gonadotropes sont situées dans la pPD et la périphérie de la PI (Calman, Lin et al. 2001) (Miranda, Strussmann et al. 2001), de manière similaire à ce qui a été observé chez le zebrafish (So, Kwok et al. 2005). Cependant, toutes ces études se limitaient à des animaux adultes. Pendant le développement embryonnaire, seule l'expression du gène *gsua* avait été déterminée par hybridation *in situ* et localisée dans la pPD au sein de l'adénohypophyse en développement à partir de 32hpf (Nica, Herzog et al. 2004). Or, la sous-unité G $\alpha$  est non seulement commune aux gonadotropines, mais elle est aussi présente dans la Tsh en association avec la Tsh $\beta$ , exprimée dans les thyrotropes. Il restait inconnu si cette population de cellules *gsua*-positives était exclusivement formée de cellules thyrotropes (*tsh $\beta$* -positives) ou bien si elle comportait en plus une fraction de gonadotropes ou de leurs précurseurs. De même, le moment et la localisation de l'apparition des premières cellules gonadotropes étaient inconnus.

Pour répondre à ces questions, nous avons profité du fait que nous avons réussi pour la première fois à détecter les ARNm *lh $\beta$*  par hybridation *in situ* pour déterminer leur localisation au cours des premiers stades de développement de l'hypophyse chez le zebrafish.

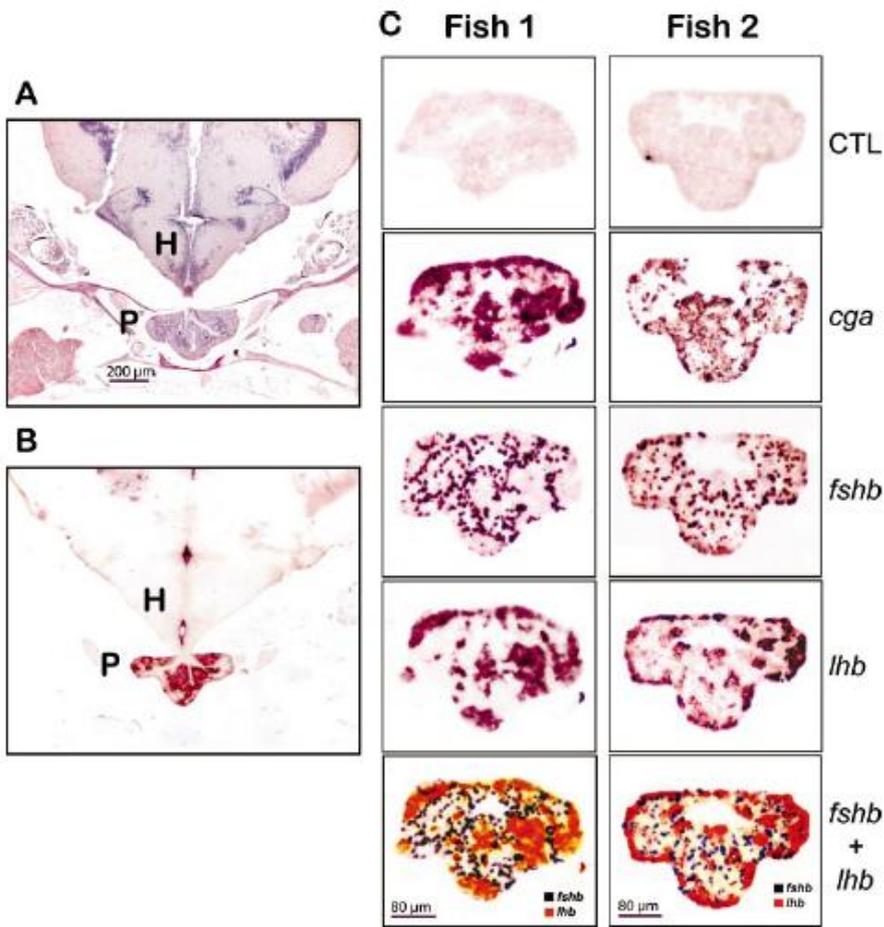


Figure 13. Profils d'expression spatiale de *fshβ*, *lhβ*, et *gsua* dans l'hypophyse de zebrafish adulte.

A) Section transversale de la tête du poisson zèbre colorée à l'hématoxyline et éosine.

B) Hybridation *in situ* avec la sonde *fshβ* montrant une coloration spécifique seulement dans l'hypophyse.

C) Deux séries de sections consécutives de deux poissons adultes colorées avec des sondes antisens *fshβ*, *lhβ*, et *gsua*. Les sections témoins (CTL) ont été colorées avec la sonde *lhβ* sens. Les images affichées en bas de chaque série présentent des images superposées de celles générées par *fshβ* et *lhβ* avec Photoshop CS. H, hypothalamus, P, pituitaire (So, Kwok et al. 2005).

## 2.2 Un type cellulaire gonadotrope dans l'hypophyse de zebrafish

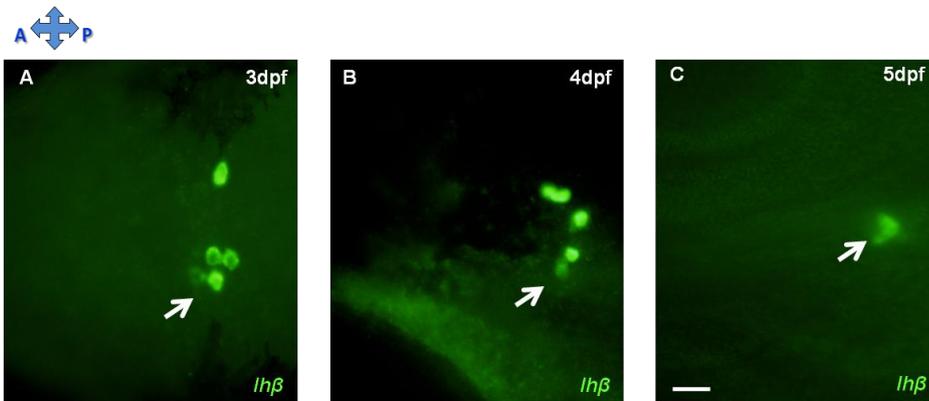
Un des objectifs du laboratoire était de décrire l'organogenèse de l'hypophyse du zebrafish en suivant l'expression des hormones et facteurs hypophysaires spécifiques. Dans ce contexte, aucune donnée n'était disponible concernant l'apparition d'un type de cellules hypophysaires important, les gonadotropes. Le profil d'expression des ARN pour les gonadotropines dans des larves de zebrafish est difficile à obtenir par hybridation *in situ* à cause de leur faible concentration à ce stade. Seule une analyse par RT-PCR avait révélée leur présence à partir de 72hpf (Nica, Herzog et al. 2006), mais ne donnait aucune information sur leur localisation.

Nous avons réussi à détecter l'expression de *lhβ* et *fshβ* dans la glande pituitaire en développement grâce à la méthode d'hybridation *in situ* fluorescente mise au point dans notre laboratoire, ce qui nous a permis de mettre en évidence le domaine d'expression de *lhβ* dans les larves de zebrafish et donc d'étudier son profil d'expression au cours du temps.

Nous observons que l'ARNm *lhβ* peut être détecté à partir du troisième jour dans quelques cellules dispersées (Fig.14A), puis ces cellules se rassemblent de manière à former un amas à 5dpf (Fig. 14B, C). Des cellules *lhβ* ont été détectées exclusivement dans la zone de l'hypophyse antérieure, aucun signal n'était visible ailleurs dans la larve à cette stade. Cette observation est en accord avec le fait que ce stade se situe loin avant la différenciation gonadique, qui débute à la troisième semaine du développement (Uchida *et al.* 2002).

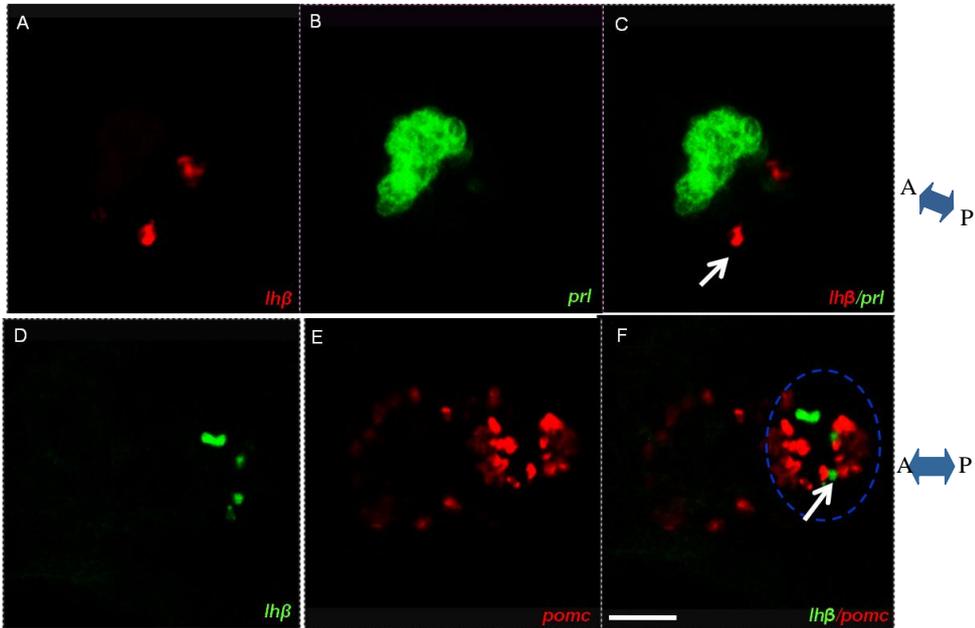
Pour encore mieux caractériser ce domaine d'expression, nous avons observé la position de l'ARNm *lhβ* en comparaison avec ceux des différentes hormones pituitaires dans les embryons de zebrafish à 4 jours. Nous observons que le domaine d'expression de *lhβ* est situé postérieurement aux cellules lactotropes (exprimant *prl*) dans l'aPD (Fig.15. A-C). L'expression de *pomc* est présente dans la PI et l'aPD, ce dernier domaine d'expression étant prolongé à sa partie antérieure par quelques neurones hypothalamiques (Fig.15. E). Il apparaît clairement que les cellules *lhβ*-positives se situent entre la PI et l'aPD, donc dans la pPD. Ce résultat est confirmé par la proximité des cellules *lhβ* avec celles exprimant *tshβ* (Fig.16. A-C) et *slβ* (Fig.16. D-F) dans le domaine pPD. Ces cellules sont proches, mais clairement différentes, contrairement aux cellules *gsua*-positives, pour lesquelles nous observons une sous-population qui co-expriment *gsua* et *lhβ* (Fig.16. G-I). Il apparaît donc que certaines des cellules *gsua* à 4dpf sont en fait des gonadotropes.

En conclusion, l'expression de *lhβ* semble occuper bilatéralement la partie postérieure de la pPD de l'hypophyse antérieure de zebrafish à partir de 3dpf (Fig.15).



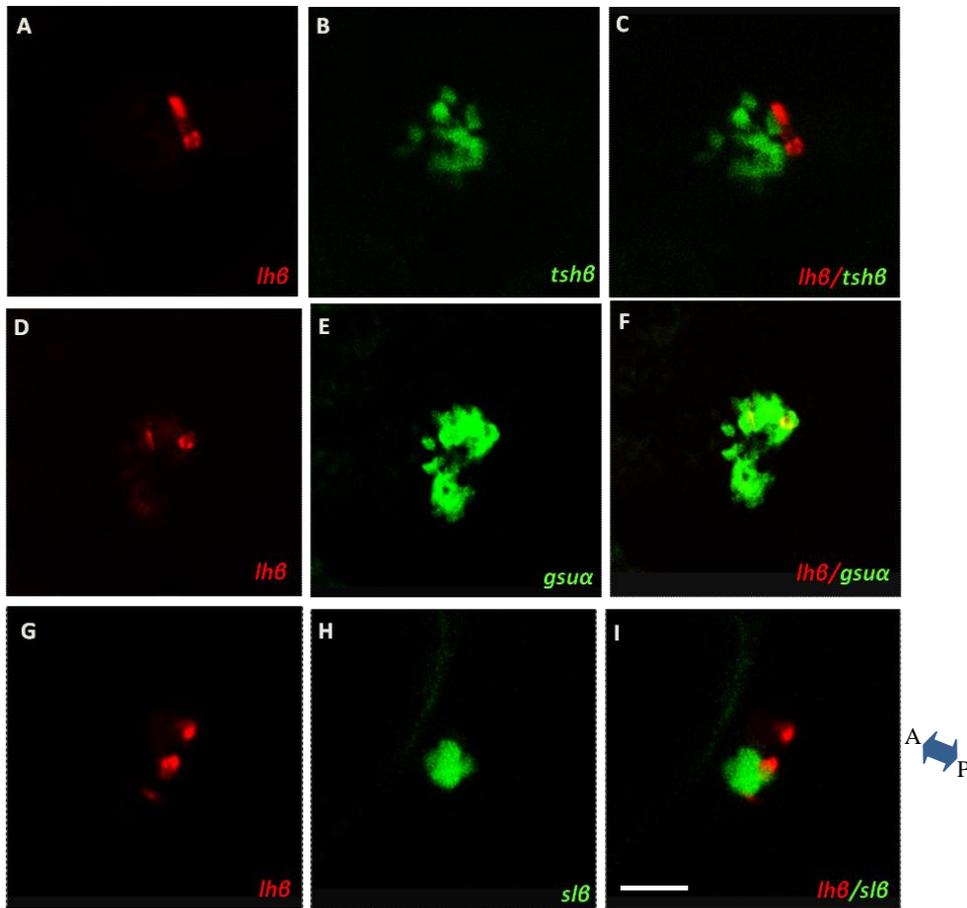
**Figure 14. Profil d'expression des transcrits *lhβ* chez le zebrafish.**

A-C, hybridation *in situ* fluorescente sur des embryons de type sauvage à différents stades, de 3 à 5dpf respectivement ; Antérieur à gauche et vue ventrale. A, *lhβ* est exprimé dans l'adénohypophyse à partir de 3dpf. B, l'expression continue à 4dpf; C, à 5dpf, l'expression de *lhβ* est observée sous forme d'amas de cellules. Barre d'échelle : 50 $\mu$ m (A-C). La flèche blanche indique les cellules *lhβ*.



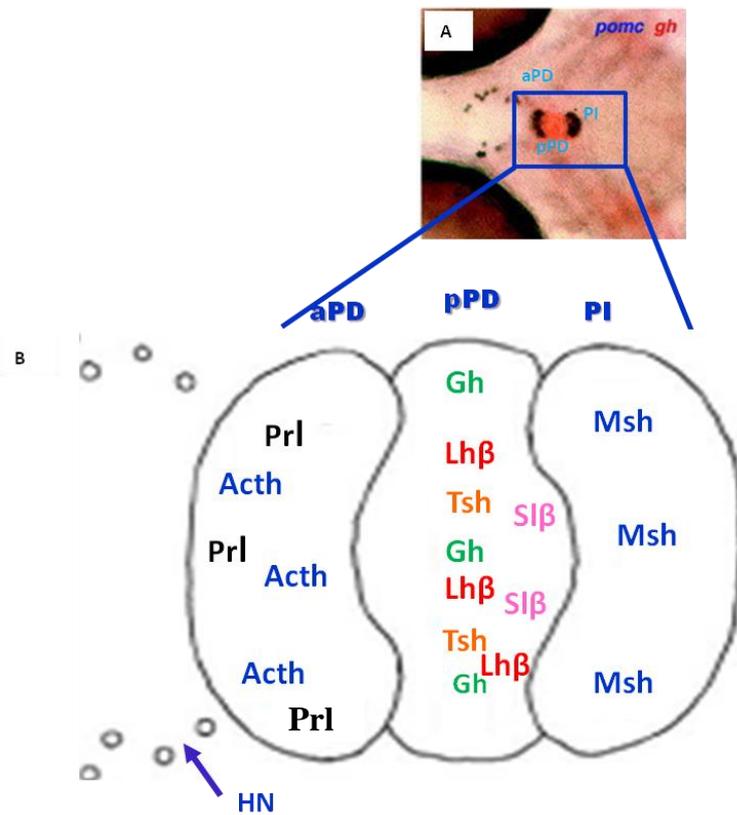
**Figure 15. Expression de *lhβ* dans la pPD de l'adénohypophyse à 4dpf.**

Hybridation *in situ* double fluorescente marquant les transcrits *lhβ* en rouge et *prl* en vert (A-C) ou *lhβ* en vert et *pomc* en rouge (D-F) à 4dpf. Antérieur à gauche et vue ventrale. C, F la superposition des images *lhβ* avec celles, respectivement, de *prl* et *pomc* montre clairement la position de *lhβ*. Barre d'échelle : 30um. (A-F), z-plan confocal d'images en vue ventrale. Le pointillé bleu entoure l'hypophyse. La flèche blanche indique les cellules *lhβ*.



**Figure 16. Expression de *lhβ* comparé à différentes hormones de la pPD dans des embryons sauvages à 4dpf.**

Hybridation *in situ* double fluorescente marquant les transcrits *lhβ* en rouge (A, D, G) et *tshβ*, *gsua* ou *slβ* en vert (B, E, H) à 4dpf. Vue ventrale, antérieur à gauche et F, I la superposition des images séparées montre la localisation de des mRNA *lhβ* par rapport à ceux de: *tshβ*, *gsua* ou *slβ* respectivement dans le pPD. F, colocalization de quelques cellules *gsua* et *lhβ*. Barre d'échelle : 30um. (A-I) plane Z d'image confocale.



**Figure. 17. Représentation schématique de la position des cellules *lhβ* dans l'adenohypophyse chez le zebrafish à 120hpf.**

A, Hybridation *in situ* double visible (*pomc-gh*) qui illustre les trois sous domaines de l'adenohypophyse. B, montre la position des cellules *lhβ* (rouge) dans les sous domaines de l'adenohypophyse. HN, cellules neuronales du diencephale. Les trois sous domaines sont indiqués: la *pars distales* antérieure (aPD), la *pars distalis* postérieure (pPD) et la *pars intermedia* (PI).

## 2.3 La fonction de Sox4b dans l'hypophyse de zebrafish

### 2.4 Résumé de l'article

Le développement et le maintien des divers types de cellules hypophysaires dépendent souvent de l'expression combinatoire de plusieurs régulateurs de transcription. Le vaste réseau de molécules de signalisation et facteurs de transcription nécessaires pour la détermination et la différenciation terminale des types spécifiques de cellules n'est pas encore entièrement compris.

Une classe de facteurs de transcription qui sont impliqués dans de nombreux processus de développement est la famille des gènes Sox, facteurs de transcription HMG-box de type SRY (SOX). Nous avons précédemment observée l'expression dans l'hypophyse d'un des orthologues de cette famille chez le poisson zèbre : le gène *sox4b*.

Dans cet article, nous avons montré que le gène *sox4b* est exprimé dans l'hypophyse primordiale à partir de 24hpf et plus tard dans toute la région de la tête, y compris l'hypophyse. À 48hpf, l'ARNm *sox4b* colocalise avec celui de *tsh $\beta$* , de la sous-unité  $\alpha$  des glycoprotéines (*gsua*) et celui codant pour le facteur de transcription en doigt de Zn Gata2a. La perte de fonction de Sox4b, réalisée par injection de morpholino spécifique ou par l'expression d'un Sox4 mutant dominant négatif, conduit à une réduction drastique de l'expression de *tsh $\beta$*  et *gsua* et une diminution du niveau d'hormone de croissance, alors que d'autres marqueurs de l'hypophyse antérieure tels que *prl*, *sl $\beta$* , *pomc* et *lim3* ne sont pas affectés.

Sox4b est également nécessaire pour l'expression de *gata2a* dans l'hypophyse. Le knockdown de l'expression de *gata2a* entraîne une diminution de l'expression de *tsh $\beta$*  et *gsua* à 48hpf, semblable aux morphants *sox4b*. De plus, l'injection d'ARNm *gata2a* dans des morphants *sox4b* restaure l'expression de *tsh $\beta$*  et *gsua* dans les cellules thyroïdiennes. Enfin, la perte de fonction du facteur *sox4b* ou *gata2a* provoque une diminution significative de l'expression des gonadotropines (*lh $\beta$*  et *fsh $\beta$* ) à 4 jours après fécondation.

En résumé, nos résultats indiquent que Sox4b est exprimé chez le poisson zèbre pendant le développement de l'hypophyse et joue un rôle essentiel pour la différenciation des cellules thyroïdiennes et gonadotropes par l'induction de l'expression du facteur Gata2a.

## 2.5 ARTICLE

### **The HMG-box transcription factor Sox4b is required for pituitary expression of *gata2a* and specification of thyrotrope and gonadotrope cells in zebrafish.**

Sox4b and Gata2a in zebrafish pituitary

Yobhana Quiroz<sup>a</sup>, Mauricio Lopez<sup>a, b</sup>, Anastasia Mavropoulos<sup>a§</sup>, Patrick Motte<sup>c</sup>, Joseph A. Martial<sup>a</sup>,

Matthias Hammerschmidt<sup>d</sup> and Marc Muller<sup>a,\*</sup>

YQ and ML contributed equally to this manuscript.

<sup>a</sup> Laboratory for Molecular Biology and Genetic Engineering, GIGA-Research, Bât. B34, Université of Liège, B-4000 Liège (Sart-Tilman), Belgium.

<sup>b</sup> present address: Institute of Hematology, Faculty of Medicine, Universidad Austral, Valdivia, Chile.

<sup>c</sup> Plant Functional Genomics and Molecular Imaging, Bât. B22, University of Liège, B-4000 Liège (Sart Tilman), Belgium, and Center for Assistance in Technology of Microscopy (CATM), Bât. B6, Université of Liège, B-4000 Liège (Sart-Tilman), Belgium.

<sup>d</sup> Institute for Developmental Biology, University of Cologne, D-50674 Cologne, Germany.

<sup>§</sup> Present adress: Department of Medicine, UCSF Diabetes Center, Hormone Research Institute, 513 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94143-0534, USA.

\* Correspondence: M. Muller

LBMGG, GIGA-R, B34, (Sart-Tilman),

Université of Liège, B-4000 Liège, Belgium

Tel: +32 4 366 4437; Fax: +32 4 366 2968

E-mail: m.muller@ulg.ac.be

**Keywords:** *sox4b*, *gata2a*, *pit1*, *tsh $\beta$* , *gsu $\alpha$* , gonadotropins, pituitary, zebrafish, differentiation.

GRANTS: FNRS; CGRI and SSTC: PAI: P5/35 and GAME

### Abstract

The pituitary is a complex gland comprising different cell types each secreting specific hormones. The extensive network of signaling molecules and transcription factors required for determination and terminal differentiation of specific cell types is still not fully understood. The SRY-like HMG-box (SOX) transcription factor Sox4 plays important roles in many developmental processes and has two homologs in zebrafish, Sox4a and Sox4b. We show that the *sox4b* gene is expressed in the pituitary anlagen starting at 24hpf and later in the entire head region including the pituitary. At 48hpf, *sox4b* mRNA colocalizes with that for thyroid stimulating hormone (*tsh $\beta$* ), glycoprotein subunit  $\alpha$  (*gsu $\alpha$* ) and the Zn finger transcription factor Gata2a. Loss of Sox4b function, using morpholino knock-down or expression of a dominant negative Sox4 mutant, leads to a drastic decrease in *tsh $\beta$*  and *gsu $\alpha$*  expression and reduced levels of *gh*, while other anterior pituitary gland markers including *prl*, *sl $\beta$* , *pomc* and *lim3* are not affected. Sox4b is also required for expression of *gata2a* in the pituitary. Knockdown of *gata2a* leads to decreased *tsh $\beta$*  and *gsu $\alpha$*  expression at 48hpf, similar to *sox4b* morphants. Injection of *gata2a* mRNA into *sox4b* morphants rescued *tsh $\beta$*  and *gsu $\alpha$*  expression in thyrotrope cells. Finally, *sox4b* or *gata2a* knockdown causes a significant decrease of gonadotropin expression (*lh $\beta$*  and *fsh $\beta$* ) at 4dpf.

In summary, our results indicate that Sox4b is expressed in zebrafish during pituitary development and plays a crucial role in the differentiation of thyrotrope and gonadotrope cells through induction of *gata2a* expression in the developing pituitary.

## Introduction

In the last decades, knowledge concerning development of the pituitary gland has been gained from identification of genes involved in human congenital pituitary hormone deficiency, a pathology characterized by hypopituitarism (Mehta and Dattani 2008). Also, spontaneous mutations and reverse genetics in murine models revealed that normal anterior pituitary formation is dependent upon a complex genetic cascade of signaling molecules and transcription factors (Zhu, Lin et al. 2005, Kelberman and Dattani 2007, Mehta and Dattani 2008). More recently, studies in mammals have been complemented by those in zebrafish that might prove useful to uncover thus far unidentified mechanisms and regulators of pituitary development and to better understand the evolution of this important gland.

The basic mechanisms of anterior pituitary (AP) development appear to be conserved between fish and mammals. The mature gland is formed of several cell types, each secreting a specific hormone (Rhodes, DiMattia et al. 1994): somatotropes producing growth hormone (Gh), lactotropes secreting prolactin (Prl) and thyrotropes synthesizing thyroid-stimulating hormone (Tsh), gonadotropes producing luteinizing hormone (Lh) and follicle stimulating hormone (Fsh). The glycoprotein  $\alpha$  subunit (Gsu $\alpha$ ) is expressed in thyrotropes and gonadotropes, where it associates respectively with Tsh $\beta$  or Lh $\beta$  and Fsh $\beta$ . Adrenocorticotrophic hormone (Acth) and melanocyte stimulating hormone, both proteolytically cleaved from the same precursor proopiomelanocortin (Pomc), are secreted by, respectively, corticotropes and melanotropes. An additional pituitary hormone is present in teleosts, the somatolactin (Sl) closely related to Prl and Gh. Two *sl* genes have been identified in zebrafish, that are expressed in specific domains of the adult gland (Zhu, Stiller et al. 2004). One of them, *sl $\beta$* , was shown to be expressed in wt zebrafish from 23 hours post-fertilization (hpf) onwards (Lopez, Nica et al. 2006)

Like in other vertebrates, the initial steps of zebrafish AP formation start when gastrulation is completed at approximately 10hpf (hours post fertilization). Specific transcription factors gradually restrict pituitary cell development and promote their differentiation into specific cell types. At this phase of development, the neural plate is bordered caudally by the neural crest and rostrally by the

Code de champ modifié

Résultat

preplacodal ectoderm (PPE). Hedgehog signaling from the ventral forebrain specifies the median region of the PPE to form the pituitary placode (Dutta, Dietrich et al. 2005). At this early stage, the PPE is characterized by the expression of multiple marker genes, such as eyes absent (*eya1*) and sine oculis (*six1*) (Nica, Herzog et al. 2006), the bicoid-related paired like homeobox gene *pitx3* or the *dlx3b* gene (Dutta, Dietrich et al. 2005, Zilinski, Shah et al. 2005). The first AP specific marker to come up during the mid-segmentation stage (18hpf-20hpf) is the Lim-domain homeobox gene *lim3*, which is expressed in all AP precursor cells. Another early marker is the POU domain homeobox factor Pit1 (Li, Crenshaw et al. 1990, Nica, Herzog et al. 2004). In contrast to the pan-pituitary marker *lim3*, *pit1* is activated just in a subset of AP cells. In mouse, loss of Pit1 function leads to absence of *gh-* and *prl-* expressing cells and a trans-fating of thyrotropes to gonadotropes (Li, Crenshaw et al. 1990, Nica, Herzog et al. 2004). Zebrafish *pit1* mutants appear to display a similar thyrotrope to gonadotrope trans-fating (Nica, Herzog et al. 2004). Another factor specifically involved in thyrotrope and gonadotrope formation in the mouse is the Zn-finger transcription factor Gata2 (Dasen, O'Connell et al. 1999). During normal thyrotrope development, Pit1 attenuates expression of the *lhβ* gene by binding and blocking the transcription factor Gata2 (Dasen, O'Connell et al. 1999).

Transcription factors of the SRY-related HMG box (SOX) family are characterized by the presence of a highly conserved, DNA-binding HMG box domain. These factors are widely and dynamically expressed throughout embryogenesis and have been implicated in many developmental processes (Wegner 1999) ranging from early cell fate determination (Avilion, Nicolis et al. 2003), control of lens development (Kamachi, Uchikawa et al. 1998, Kondoh, Uchikawa et al. 2004, Lang 2004) or chondrogenesis (Smits, Dy et al. 2004, Ikeda, Kawaguchi et al. 2005, Pevny and Placzek 2005). Sox3 was the first member of this family to be associated with X linked hypopituitarism in mice and humans (Solomon, Ross et al. 2004, Woods, Cundall et al. 2005). It is expressed in the ventral diencephalon and in the infundibulum, adjacent to the Rathke's pouch, but not in the presumptive anterior pituitary (Laumonier, Ronce et al. 2002, Solomon, Ross et al. 2004, Woods, Cundall et al. 2005). Sox2 was similarly found to be critical for the development of the hypothalamo-pituitary axis by maintaining a pool of undifferentiated cells in the pituitary (Kelberman, Rizzoti et al. 2006, Kelberman, de Castro et al. 2008).

Code de champ modifié

## Résultat

Sox4 is a member of the group C Sox proteins that contains a C-terminal transcription activation domain conserved within this group and has been involved in the development of various structures (Ya, Schilham et al. 1998, Hunt and Clarke 1999, Cheung, Abu-Elmagd et al. 2000, Busslinger 2004, Friedman, Bangur et al. 2004). Two Sox4 homologs are present in zebrafish, only *sox4b* was shown to be expressed in pancreas and required for differentiation of glucagon-expressing cells (Mavropoulos, Devos et al. 2005), similar to the function of Sox4 in normal development of pancreatic islets in mouse (Wilson, Yang et al. 2005). Recently, SOX4 was found to be one of the main transcription factors expressed in fetal pituitary in human (Ma, Qi et al. 2009). However, its function in the pituitary has not been investigated so far.

Here, we investigate the function of the zebrafish Sox4 homolog, Sox4b, in pituitary development. We show that *sox4b* is specifically expressed in the anterior pituitary primordium at 24 and 48hpf, more specifically in *gsu $\alpha$ -*, *gata2a-* and *tsh $\beta$ -*expressing cells. We show that *sox4b* is required for the differentiation of thyrotrope and gonadotrope cells and finally we demonstrate that *gata2a* expression is regulated by Sox4b in developing zebrafish pituitary.

Code de champ modifié

## Materials and methods

### Zebrafish maintenance, mutant lines and microinjection

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained under standard conditions (Westerfield 1995) in the GIGA-R zebrafish facility. Wild type embryos from the AB strain were produced and staged according to Kimmel (Kimmel, Ballard et al. 1995). The *pit1* mutant was previously described (Herzog, Sonntag et al. 2004, Nica, Herzog et al. 2004, Nica, Herzog et al. 2006).

Antisense morpholinos (Gene Tools) were used: Standard control morpholino (coMO): 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3' is known to have no target and no significant biological activity in zebrafish embryos, *sox4b*MO 5'-GACTCAGTCTGATTGCACACAGTCC-3' and *sox4b*MO2 5'-TGCTGCTGGATCTCTGGAGCAT-3'; targeting the 5'-UTR of *sox4b* or the first 25 bases of the coding sequence, respectively to block translation were previously described (Mavropoulos, Devos et al. 2005) and were injected at an optimal dose of 7 ng/egg or 2 ng/egg, respectively; *gata2a*MO: 5'-CATCTACTCACCAGTCTGCGCTTTG-3' is a splice blocking morpholino targeting the third exon/intron boundary of the *gata2a* gene (30) and was used at a doses of 0.5ng/egg.

mRNA coding for the dominant negative mutant *sox4b*ΔC (36) or EGFP was injected at 0.2 ng/egg. To perform phenotypic rescue experiments, *gata2a* mRNA was synthesized and then injected into *sox4b* or *gata2a*MO injected or wt embryos at concentrations of 100 pg and 75 pg, respectively. MOs were diluted in Danieau's buffer containing 0.5% Rhodamin dextran for checking the injection.

Microinjection was performed at the 1-cell stage; the injected embryos were fixed at different stages in 4% paraformaldehyde and stored in 100% methanol before analysis.

### *Riboprobes, whole-mount in situ hybridization*

Single and double whole mount and double fluorescent *in situ* hybridizations were performed as previously described (Hauptmann and Gerster 1994) (36) on wild-type and mutant embryos. Antisense RNA probes were prepared by transcribing linearized cDNA clones with SP6, T7, or T3

Code de champ modifié

## Résultat

polymerase using digoxigenin labeling mix (Roche) or DNP-11-UTP ribonucleotides (TSAi Plus system, Perkin Elmer). The riboprobes used were: *lim3*, *gata2a*, *pit1*, *prl*, *gsuα*, *tshβ*, *gh* and *slβ* (Detrich, Kieran et al. 1995, Glasgow, Karavanov et al. 1997, Herzog, Zeng et al. 2003, Nica, Herzog et al. 2004, Lopez, Nica et al. 2006) as described. The *lhβ* cDNA (438 bp) (Acc #: HE608243) covering the partial coding region was obtained by performing RT-PCR on mRNA from 5 dpf old zebrafish larvae using the primers zLHBfor3 (cagcctgctgagcaac) and zLHBrev1 (cctctctctgggacatgcagaag) and contained three silent mutations relative to the reference *lhβ* sequence.

### Fluorescence Imaging

For confocal analysis, images were acquired using a Leica TCS SP2 inverted confocal laser microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) equipped with one argon and two helium-neon lasers. Digitized images were acquired using a 10X (NA 0.4) or 63X (NA1.4) Plan-Apo water-immersion objectives at 1024X1024 pixel resolution. The diameter of the pinhole was set up equal to the Airy unit. Series of optical sections were carried out to analyze the spatial distribution of fluorescence, and for each embryo, they were recorded with a Z-step ranging of 2.0 μm. Images were acquired under identical conditions and we ensured that the maximal fluorescence signal was not saturating the photomultiplier tubes (PMT). For multicolor imaging, FITC was visualized by using an excitation wavelength of 488 nm and the emission light was dispersed and recorded at 500–535 nm. Cy3 was detected by using an excitation wavelength of 543 nm and the 488/543 dichroic mirror, the emission light was dispersed and recorded at 595–650 nm. The acquisition was set up to avoid any crosstalk of the two fluorescence emissions. Captured images were exported as TIFF format files and further processed using Adobe Photoshop.

### RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from about 100 larvae/experiment using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. After extraction, the quality and

Code de champ modifié

## Résultat

concentration of total RNA was evaluated by electrophoresis on capillary gel and the ratio of absorbance at 260/280nm by spectrophotometer. Synthesis of cDNA was performed from 1µg of total RNA, which was reverse transcribed using the transcriptor iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad, Nazareth, Belgium) according to the manufacturer's instructions.

### Real Time-PCR

Gene-specific oligonucleotide primers were developed using the Primer3 software and selected so as to span exon-exon junctions to avoid detection of genomic DNA (see table 3 for primers used in quantitative RT-PCR) and synthesized by Eurogentec.

Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) with SYBR green fluorescent label. Samples (25 µl final vol) contained the following: 1X SYBR green master mix (Diagenode), 150 nmol of each primer, and 1 µl of the RT reaction (1/20 of the total cDNA). Samples were run in duplicate in optically clear 96-well plates (ABgene). Cycling parameters were as follows: 50°C x 2 min, 95°C x 10 min, then 40 cycles of the following 95°C x 15 s, 60°C x 1 min. A melting temperature-determining dissociation step was performed at 95°C x 15 s, 60°C x 15 s, and 95°C x 15 s at the end of the amplification phase. For analysis by end point PCR, the final products of the qRT-PCR obtained after 40 PCR cycles were loaded on agarose gel for electrophoresis.

For the test of gonadotropin expression (*lhβ* and *fshβ*), thermal cycling was performed on an Applied Biosystems 7900 HT sequences Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA was used for quantitative real-time PCR with the SensiMix™ SYBR Kit (Bioline, USA), containing Sybr green. The standard conditions were used with a modification in the elongation step: 62°C x 20s for *lhβ* and 62°C X 30s for *fshβ* were used.

No template controls were run for all reactions and all RNA preparations were subjected to sham reverse transcription to check for the absence of genomic DNA amplification. The relative transcript level of each gene was obtained by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Pfaffl 2001) and normalized relative to the housekeeping gene elongation factor1α (*ef1α*) with the program SDS 2.2. Results are presented as

Code de champ modifié

## *Résultat*

percentage expression in morpholino-injected embryos relative to clutchmate control embryos  $\pm$  standard deviation.

### *Statistical Analysis*

Statistical Analysis was performed on raw data using one-way analysis of variance (ANOVA). Significance was set at  $P < 0.01$ . Data from biological replicates were averaged and shown as mean normalized gene expression  $\pm$  SD.

## Results

### *Sox4b is expressed in the developing anterior pituitary*

The expression pattern of *sox4b* mRNA in developing pituitary was determined by whole mount *in situ* hybridization (WISH) experiments in zebrafish embryos. Starting at 24hpf, *sox4b* mRNA was detected in the anterior border of the neural plate, corresponding to the early pituitary placode (Fig. 1A). At 26hpf, *sox4b* expression is increased in the adjacent ventral diencephalon and predominant in the telencephalon (Fig. 1B), while at later stages (48hpf) *sox4b* mRNA is detected in broad regions of the developing forebrain, midbrain and in a subpopulation of cells in the developing anterior pituitary (Fig. 1C). Double fluorescent *in situ* hybridizations analyzed by confocal microscopy revealed that *sox4b*-positive cells in the ventral neural layer also express the pituitary precursor marker *lim3* at 30hpf, confirming that they are located in the anterior pituitary primordium (Fig. 1D-G). Finally, at 48hpf, a clear co-localization of *sox4b* mRNA was observed with *tsh $\beta$*  mRNA (Fig. 1H-K), suggesting that *sox4b* is expressed in thyrotrope cells.

*Sox4b* expression was also assessed in the previously described pituitary mutant *pit1* (Herzog, Sonntag et al. 2004, Nica, Herzog et al. 2004, Nica, Herzog et al. 2006). *Sox4b* mRNA was readily detected in pituitaries of *pit1* mutant embryos similar to their heterozygous or wt siblings at 24hpf (Fig. 1L,M).

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

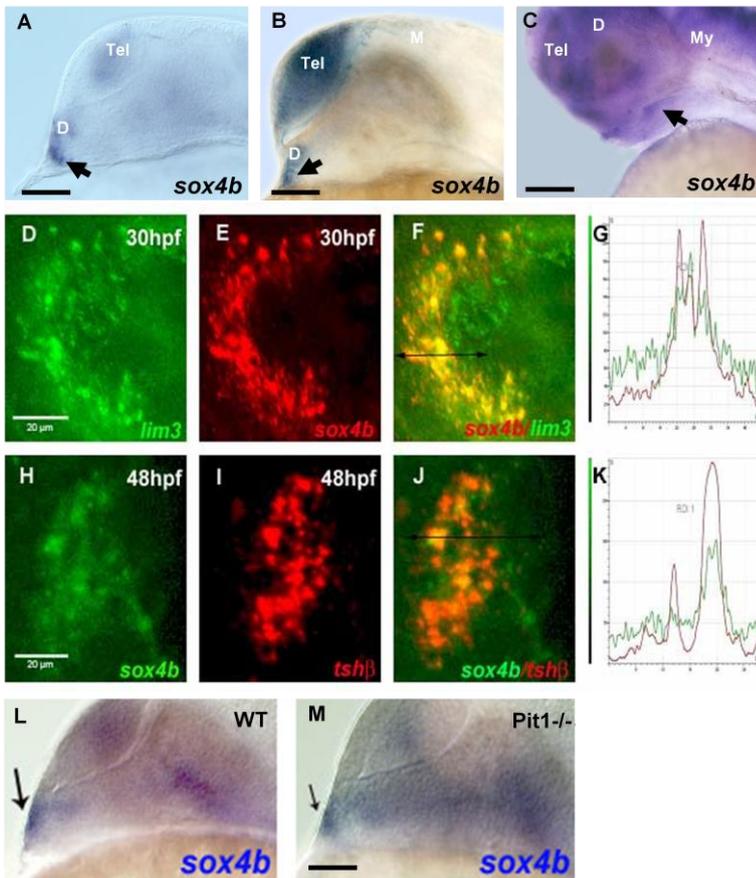


Fig. 1. *sox4b* is expressed in the pituitary during zebrafish organogenesis.

WISH was performed on wild type zebrafish embryos using the *sox4b* antisense probe. (A-C) Lateral views, anterior to the left, dorsal to the top: wild type embryos labeled with the *sox4b* probe (blue) by whole-mount in situ hybridization (WISH). The arrowheads indicate the pituitary placode at 24hpf (A), 26hpf (B), 48hpf (C), respectively. (D-F) Analysis by double fluorescent WISH, anterior to the left, one Z plane of the confocal images is shown. (D-F) Expression of *sox4b* (red, E) and the pan-adenohypophyseal marker *lim3* (green, D) colocalize in the pituitary placode (F), (G) Fluorescence emission quantification in F. (H-J) *sox4b* (green, H) and *tshβ* (red, I) are co expressed in a sub-type of pituitary cells (J). (K) Fluorescence emission quantification in J. (D-F, H-J) the ventral head regions were dissected before confocal microscopy. (L- M) *sox4b* expression does not require *pit1* at 24hpf. Analysis of *sox4b* expression by WISH in wt and homozygous *pit1* mutants. Lateral view, anterior to the left, the arrow indicates the label in the pituitary. Scale bars: (A, B, C, L-M) 100µm, (D-J) 20µm. Tel, telencephalon, D, diencephalon, M, mesencephalon, My, myelencephalon.

***Knock-down of Sox4b eliminates expression of tsh $\beta$  and gsua in the pituitary***

To investigate the function of Sox4b in pituitary development, we microinjected antisense morpholino oligonucleotides (MOs) to ablate *sox4b* expression as previously described (Mavropoulos, Devos et al. 2005) and analyzed specific gene expression by WISH and by quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR) in 48hpf embryos. Control experiments checking pancreatic markers in the injected embryos confirmed the previously observed effect on *glucagon* expression (Mavropoulos, Devos et al. 2005) (Table 1). When the presence of the various pituitary hormone mRNAs was investigated in these morphants (summarized in Table 1), we observed a drastic reduction of *tsh $\beta$*  expression in *sox4b*MO injected embryos at 48hpf (Fig. 2A,D). Similarly, the expression of *gsua* was specifically reduced in *sox4b* morphants (Fig. 2B,E), indicating that the two hormone subunits specific to thyrotrope cells are no longer expressed in these embryos. *gh* expression was reduced in 83% of the *sox4b*MO-injected embryos (Fig. 2C,F), while *sl $\beta$* , *prl*, and *pomc* (Fig. 2G-L) did not seem to be affected. Expression of *gh*, *tsh $\beta$*  and *gsua* was also absent in 4 dpf *sox4b* morphants (table 1) and in 48 hpf embryos previously injected with a different morpholino (*sox4b*MO2) against *sox4b* (table 2). To confirm these results observed by *in situ* hybridization, qRT-PCR reactions were performed using mRNA extracted from microinjected 48hpf morphants and control embryos. The results confirmed the strong down-regulation of *tsh $\beta$* , *gsua* and *gh* expression (Fig. 3) while *prl*, the widely expressed *lim3* factor (see also below) or the control mRNA *ef1a* (elongation factor 1) were not affected.

To confirm the specificity of the effects observed by morpholino injection, we abolished Sox4b function by microinjecting an mRNA coding for a Sox4b dominant-negative mutant, lacking its transactivation domain (*sox4b $\Delta$ C*) (Mavropoulos, Devos et al. 2005)). Injection of *sox4b $\Delta$ C*mRNA into wild type embryos also resulted in a decrease of *gsua*, *tsh $\beta$*  and *gh* expression, while *prl* is not affected (Fig. 4), thus confirming the specificity of the defects observed upon morpholino injection.

In conclusion, our results indicate that *sox4b* knock-down specifically affects expression and differentiation of thyrotrope and somatotrope cells.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

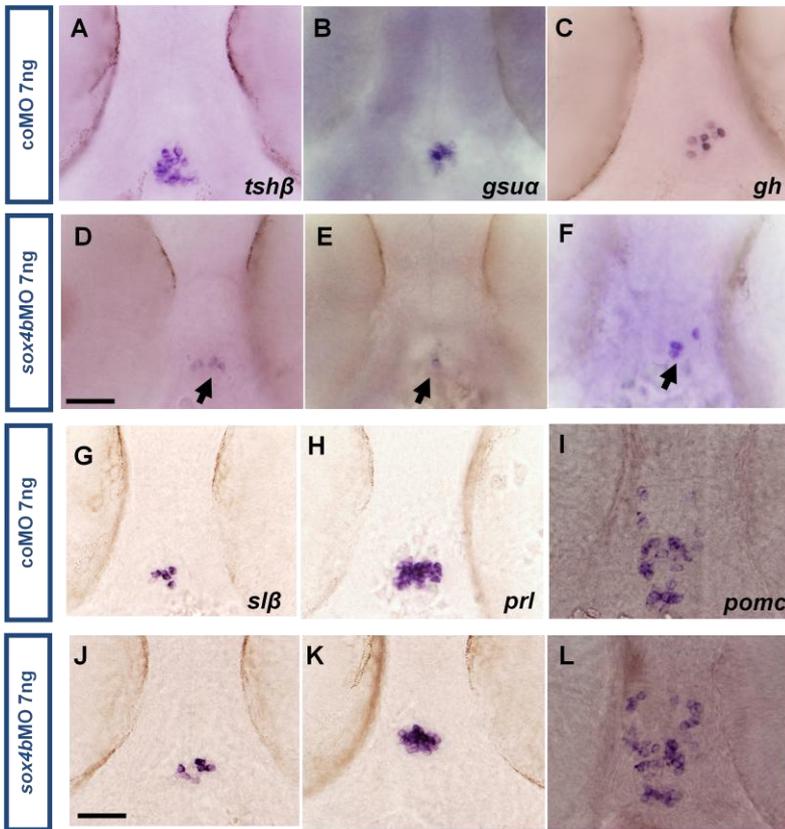


Fig. 2. *sox4b* knockdown decreases *tshβ*, *gsua* and *gh* expression in 48hpf embryos.

Fertilized eggs were microinjected with *sox4b*MO and analyzed by WISH for pituitary hormone expression. (A-C, G-I) control embryos; (D-F, J-L) *sox4b* morphants, ventral views, anterior to the top. Both *tshβ* (D) and *gsua* (E) expression are almost completely lost, while *gh* expression is decreased (F) and *slβ*, *prl* and *pomc* are unchanged (J-L). Scale bars are 50μm (A-L).

Table 1

<b>Embryo 48hpf</b>	<b>NI normal</b>	<b>coMO normal</b>	<b>sox4bMO absence</b>	<b>sox4bMO decrease</b>
<i>tshβ</i>	10/10	89/100	12/122	110/122***
<i>gsuα</i>	10/10	38/40	0/38	38/38***
<i>glucagon</i>	10/10	70/78	0/78	78/78***
<i>slβ</i>	8/10	38/40	5/40	0/40
<i>pomc</i>	10/10	40/40	0/40	0/40
<i>lim3</i>	10/10	38/38	2/40	0/40
<i>pit1</i>	10/10	27/27	0/35	0/35
<i>gata2a</i>	10/10	40/40	38/40***	0/40
<i>Gh</i>	9/10	45/45	0/58	48/58***
<i>Prl</i>	10/10	50/50	0/50	0/50
<b>Larvae 4dpf</b>	<b>NI normal</b>	<b>coMO normal</b>	<b>sox4bMO absence</b>	<b>sox4bMO decrease</b>
<i>Lhβ</i>	10/10	50/50	0/50	28/50
<i>Tshβ</i>	10/10	50/50	12/50***	15/50***
<i>Gsua</i>	10/10	50/50	0/50	30/50***
<i>Gh</i>	10/10	50/50	0/50	25/50***
<i>Prl</i>	10/10	50/50	0/50	0/50

Sox4b regulates expression of *tshβ*, *gsuα* and *lhβ* in zebrafish.

Individual embryos, previously non injected (NI) or injected with coMO or *sox4bMO*, were optically analyzed and compared for expression of different marker genes at 48hpf and 4 dpf. The embryos were classified according to phenotype and the number of each class is given relative to the total number of analyzed embryos for each condition. Absence: lost expression; decrease: marker expression was reduced by more than 50%. \*\*\*significant at  $p < 0,001$ .

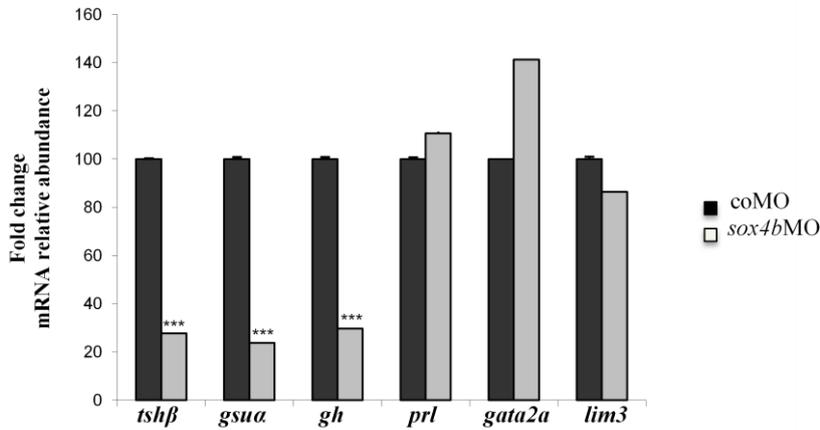


Fig. 3. qRT-PCR analysis of mRNA extracted from control and *sox4b* morphants.

Total RNA was extracted from 48 hpf embryos injected with coMO or *sox4b*MO and specific mRNA levels were determined by qRT-PCR. mRNA levels in control embryos were arbitrarily set to 100 for each primer pair and mean relative levels  $\pm$  standard error. The results shown are representative of three independent experiments for each mRNA.\*\*\*significant at  $p < 0,001$ .

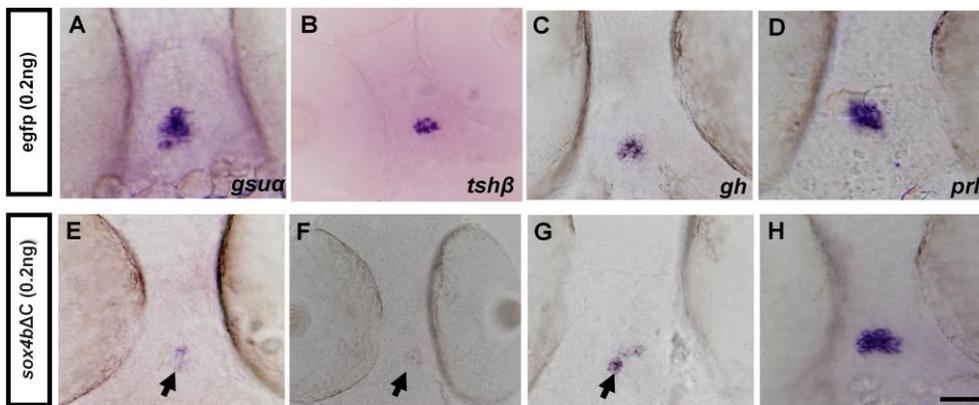


Fig. 4. Expression of the dominant-negative Sox4bΔC mutant decreases thyrotrope gene expression.

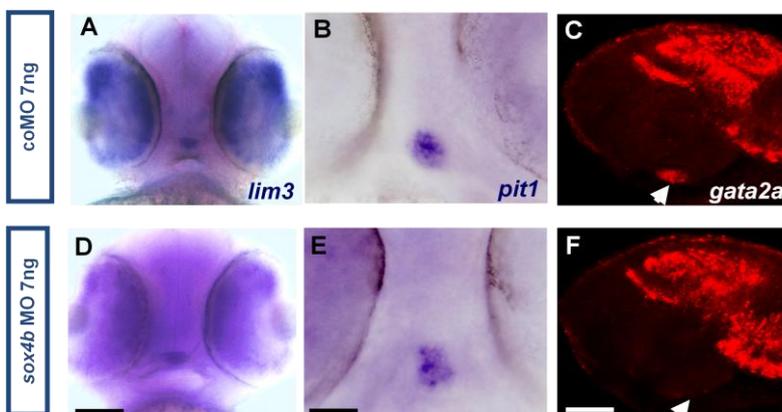
*sox4bΔC* mRNA or *egfp* mRNA was microinject into fertilized eggs and WISH experiments were performed to detect *gsua* (A,E), *tshβ* (B,F), *gh* (C,G) or *prl* expression (D,H) at 48 hpf. Ventral views, anterior to the top, scale bar 50μm. Arrowheads in E to G point to the decreased expression in thyrotrope cells.

### Sox4b is required for the expression of *gata2a* specifically in the pituitary

In order to shed some light on the molecular mechanisms involved in Sox4b function in the pituitary, we tested for the expression of known transcription factors in *sox4b* morphants. The pan-pituitary marker *lim3* was not affected upon *sox4b* knock-down (Fig. 5A,D and table 1). One of the factors required for thyrotrope differentiation is the pituitary-specific, POU-homeo domain factor Pit1 (Li, Crenshaw et al. 1990). Zebrafish *pit1* mutants were shown to be deficient in *prl*, *gh*, *slβ* and *tshβ* expression (Nica, Herzog et al. 2004, Lopez, Nica et al. 2006). At 48hpf, *sox4b*MO injected embryos displayed unaltered *pit1* expression in a frontal view (Fig. 5B,E).

Another factor specifically involved in pituitary thyrotrope formation in mouse is the Zn-finger transcription factor Gata2 (Dasen, O'Connell et al. 1999, Charles, Saunders et al. 2006). Although *gata2a* is widely expressed in the head region of the developing embryos at 48hpf, we could clearly observe that its weak expression in the pituitary of control MO injected embryos was completely absent in *sox4b* morphants (Fig. 5C,F). Although qRT-PCR cannot directly assess the amount of *gata2a* or *lim3* expression in the pituitary due to their wider expression in the head region, it is noteworthy that the overall amount of *gata2a* and *lim3* mRNA was unchanged (or slightly increased) in the *sox4b* morphants (Fig. 4).

In conclusion, our data indicate that *sox4b* knock-down specifically affects the expression of *gata2a* in the developing pituitary and blocks differentiation of thyrotrope cells.



**Fig. 5. *sox4b* knockdown leads to decrease expression of *gata2a*.**

Fertilized eggs were microinjected with *sox4b*MO and analyzed by WISH for expression of *lim3* and *pit1* or by single fluorescent whole-mount *in situ* hybridization for *gata2a* (red) in the embryos at 48hpf. (A-C) control, (D-F) *sox4b*MO injected embryos. (A, D) ventral view, anterior to the top, scale bar: 100µm; (B, E) ventral view, anterior to the top, scale bar: 50 µm; (C, F) Z-plane confocal image lateral view, anterior to the left, scale bar: 60µm. Arrowheads in C and F point at the position of *gata2a* expression in the pituitary.

***Sox4b* and *gata2a* are specifically co-expressed in the anterior pituitary**

Expression of *gata2a* was clearly observed in the pituitary at 48hpf (Fig. 6A). Relative to the *pomc*-expressing corticotropes (Fig. 6B) and the *prl*-expressing lactotropes (Fig. 6C) located at the anterior border of the pituitary, *gata2a*-expressing cells are detected in a posterior domain. Double fluorescent *in situ* hybridization revealed that *gata2a* is clearly co-expressed with *gsuα* (Fig. 6D-G). Similarly, *gata2a* mRNA is colocalized with *sox4b* mRNA (Fig. 6H-K) and is also present in *tshβ*-expressing cells, while some *gata2a*-positive cells did not express *tshβ* (Fig. 6L-N), probably representing gonadotrope precursor cells. No co-localization was observed between *gata2a* and *gh* mRNA (Fig. 6O-Q)

Expression of *gata2a* was also tested by double *in situ* hybridization in the previously described *pit1* mutant (Herzog, Sonntag et al. 2004, Nica, Herzog et al. 2004, Nica, Herzog et al. 2006). We observed that expression of *gata2a* was similar to wt or heterozygous siblings at 48hpf (Fig. 6R,S).

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

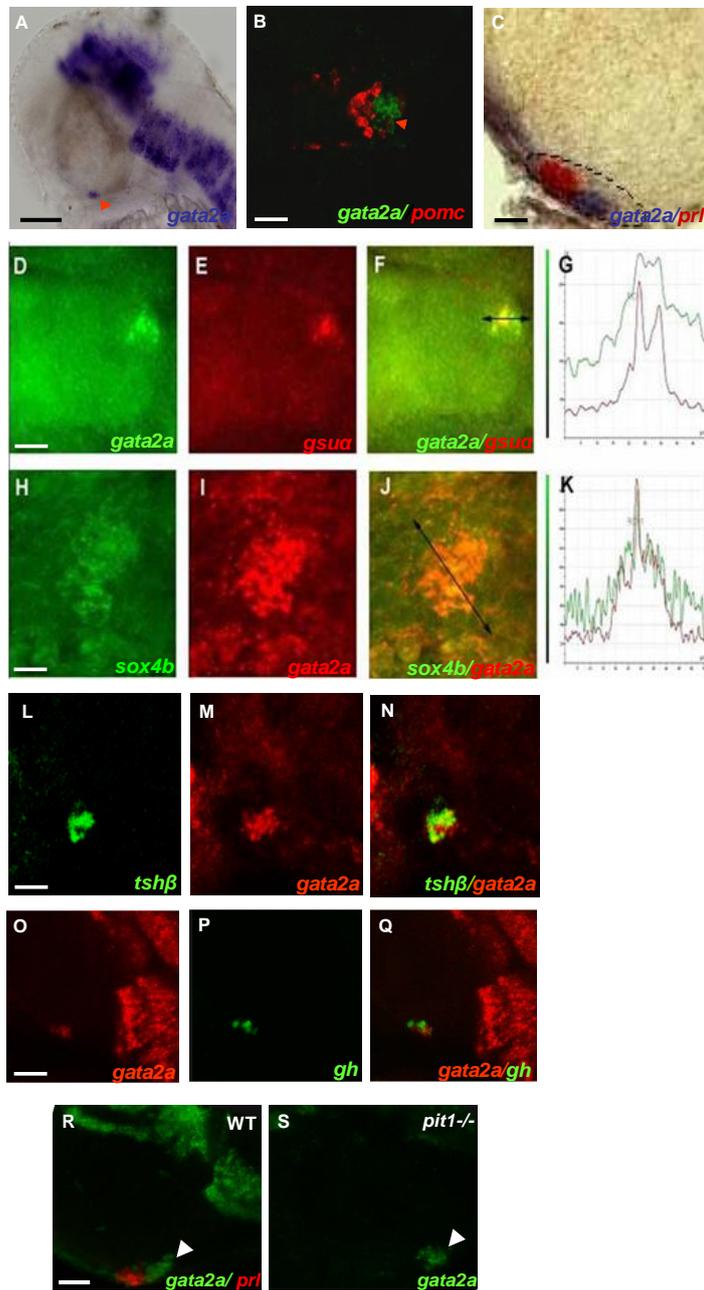


Fig. 6. *gata2* mRNA is detected in *sox4b*- and *gsud*-expressing cells in 48hpf embryos.

WISH was performed on wild type zebrafish embryos using the *gata2a* antisense probe. (A,C) lateral view, anterior to the left; B, ventral view, anterior to the top. (A) scale bar: 100µm; (B), 45µm; C, 40µm. Arrowhead in A points at *gata2a* expression in the pituitary. (A) single probe *gata2a* (blue), (B) Double fluorescent whole-mount *in situ* hybridization showing *gata2a* (green) and *pomc* (red) mRNA; Z- plane confocal image; (C) Double WISH showing *gata2a* (blue) and *prl* (red) mRNA, the ventral head regions were dissected before microscopy. (D-N) Double fluorescent WISH showing co-expression: (D-G) of *gata2a* (green, D) and *gsua* (red, E); (F) overlay of panels D and E; (G) fluorescence emission quantification in F. (H-K) *sox4b* (green, H) and *gata2a* (red, I), (J) overlay of panels H and I, (K) Fluorescence emission quantification in J. (L-N) *tshβ* (green, L) and *gata2a* (red, M), N, overlay of *tshβ* and *gata2a* expression. (D-N) Z- plane confocal image, ventral views, anterior to the left. (O-Q) Z- plane of the confocal images, lateral view anterior to the left is shown; *gata2a* (red, O) and *gh* (green, P), Q, overlay of *gata2a* and *gh* expression. (R-S) *gata2a* expression in wild type (WT) and *pit1* mutants (*pit1*<sup>-/-</sup>) are shown in upper right corner in embryos at 48hpf. Analysis by double fluorescent WISH, lateral view anterior to the left, one Z plane of the confocal images is shown; *gata2a* (green, R-S) and *prl* (red, R) is shown, the arrowhead points to *gata2a* expression in the pituitary (R-S). (D-F) scale bar: 40µm, (H-J) scale bar: 20µm, (L-N, R-S) scale bar: 40µm. (O-Q) scale bar: 60 µm.

#### ***Depletion of gata2a leads to loss of thyrotrope cells.***

To compare the effects of *gata2a* and *sox4b* depletion in developing embryos, we microinjected *gata2a* MO (Galloway, Wingert et al. 2005) into fertilized eggs and analyzed hormone expression in 48hpf embryos. Expression of *tshβ* and *gsua* were drastically reduced in *gata2a* morphants relative to control MO-injected embryos (Fig. 7A,B,E,F), whereas *prl* expression was not affected (Fig. 7I,J) at 48hpf. When we co-injected mRNA coding for *gata2a* together with *gata2a* MO, expression of both *tshβ* and *gsua* was clearly rescued (Fig. 7C,G), while injection of *gata2a* mRNA alone had no effect (Fig. 7D,H).

Collectively, our results show that the defects due to *gata2a* depletion are very similar to those in *sox4b* morphants, suggesting that the two factors are components of a common pathway.

Code de champ modifié

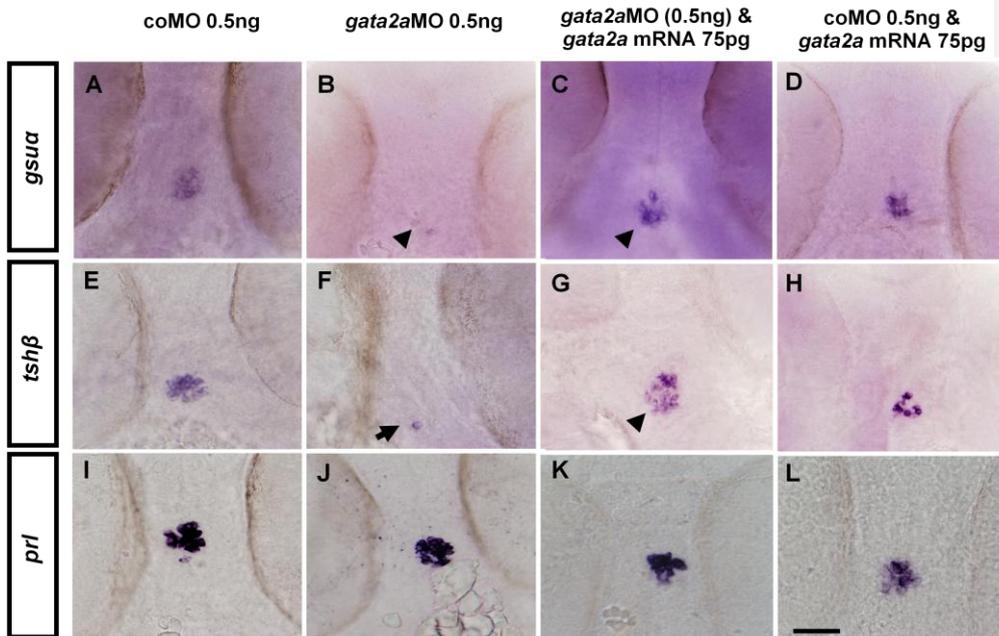


Fig. 7. Thyrotrope expression depends on *gata2a* expression.

WISH analysis for expression of *tshβ*, *gsua*, *prl* in 48hpf embryos previously microinjected with (A,E,I) coMO; (B,F,J) *gata2a*MO, (C,G,K) *gata2a*MO and *gata2a* mRNA or (D,H,L) coMO and *gata2a* mRNA. (A-L) ventral views, anterior to the top. Scale bar: 50μm.

#### ***Exogenous Gata2a rescues Sox4b depletion in the pituitary***

To understand the relationship between Gata2a and Sox4b in the regulatory pathways, we next asked whether ectopic expression of *gata2a* could restore expression in *sox4b* depleted embryos.

Injection of *sox4b*MO resulted in a decrease of *tshβ* and *gsua* expression, as expected, while co-injection of *gata2a* mRNA together with *sox4b*MO completely restored this expression at 48hpf (Fig. 8).

Taken together, our results demonstrate that the presence of Sox4b is required for *gata2a* expression in the pituitary, which itself is required for thyrotrope differentiation.

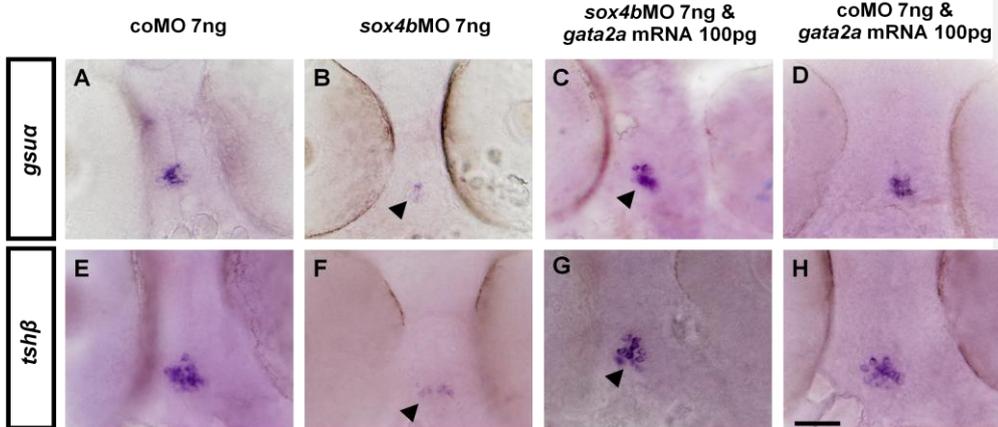


Fig. 8. Expression of exogenous Gata2a rescues the pituitary defects in *sox4b* morphants.

WISH analysis for expression of *tshβ* and *gsua* in 48hpf embryos previously microinjected with (A,E) coMO; (B,F) *sox4b*MO; (C, G) *sox4b*MO and *gata2a* mRNA or (D,H) coMO and *gata2a* mRNA. (A-H) ventral views, anterior to the top. (A-L) scale bar: 50μm.

### ***Sox4b and gata2a are both involved in the expression of gonadotropins (fshβ, lhβ) in the zebrafish developing pituitary***

Gata2 is known in mouse to be required for expression of gonadotropins, while our own results show that both Gata2a and Sox4b control expression at 48hpf of *gsua*, the hormone subunit common to thyrotropes and gonadotropes. Consequently, we considered the possibility that both transcription factors might play a role also in gonadotropin expression.

Previous studies suggested that *fshβ* (follicle stimulating hormone) and *lhβ* (luteinizing hormone) transcript levels in the larval zebrafish pituitary are extremely low and only detectable via RT-PCR at 72hpf (Nica, Herzog et al. 2006). Therefore, we first tested the gonadotropin β subunit mRNA levels by qRT-PCR in RNAs extracted from 4 dpf larvae previously microinjected with controlMO or MOs directed against *sox4b* or *gata2a*. The results show that in *sox4b* morphants (Fig. 9A) and in *gata2a* morphants (Fig. 9B), both *lhβ* and *fshβ* mRNA levels are clearly decreased relative to control MO injected larvae. When we analysed *lhβ* expression by fluorescent *in situ* hybridization in 4 dpf larvae, we could clearly detect several *lhβ*-expressing cells in the controls, while no or only weakly labeled cells were detected in *sox4b* morphants (Fig. 9C). As an internal control for the efficiency of *in situ*

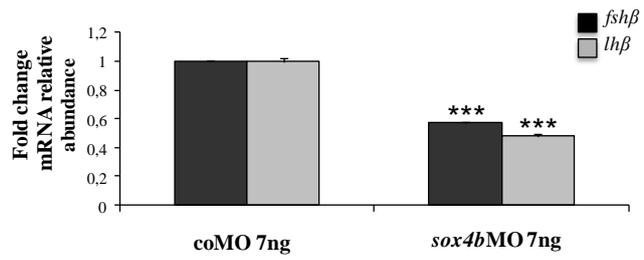
Code de champ modifié

## Résultat

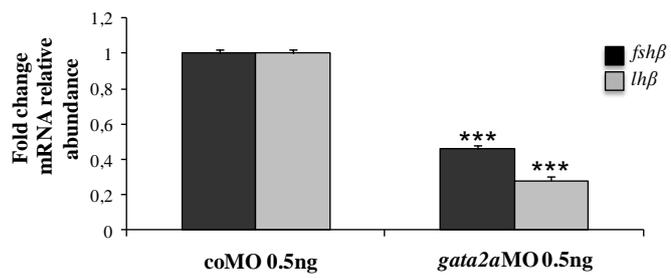
hybridization and detection, we used in parallel a probe for the pancreatic marker insulin (*ins*), whose signal was not affected by *sox4b*MO injection.

Taken together, these results show that Sox4b and Gata2a are both required for gonadotropin expression in zebrafish pituitary.

**A**



**B**



**C**

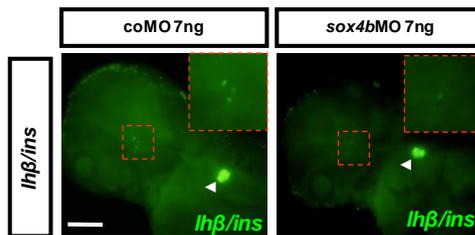


Fig. 9. Both Sox4b and Gata2a are required for gonadotropin expression.

Expression of *lhβ* and *fshβ* was measured by qRT-PCR in RNA extracted from *sox4b* morphant (A) and *gata2a* morphant (B) larvae of 4dpf. The data were normalized relative to the *ef1a* transcript and the levels in coMO injected embryos were arbitrarily set to 1. Mean fold change relative to control morphants is shown with the corresponding SD (n=3),\*\*\*significant at  $p < 0,001$ . The results shown are representative of three independent experiments. (C) Analysis by double fluorescent WISH for expression of *lhβ* and *ins* at 4 dpf previously microinjected with coMO or *sox4b*MO, pancreatic *ins* (arrowhead) expression was assessed as invariant control. (C) ventral view, anterior to the left, scale bar: 200μm.

**Discussion**

The Sox4 transcription factor is highly conserved in vertebrates, encoded by a single exon and expressed in different tissues during embryonic and adult life. In mammals, Sox4 is essential for heart, lymphocyte and thymocyte development (Schilham, Oosterwegel et al. 1996). Furthermore, Sox4 was shown to be required for normal endocrine pancreas development in mouse (Wilson, Yang et al. 2005). Recently, SOX4 expression was found in the human fetal pituitary (Ma, Qi et al. 2009).

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

In zebrafish, two homologs for the mammalian *Sox4* gene exist, only one of them, *sox4b* was shown to be required for glucagon-producing cell differentiation (Mavropoulos, Devos et al. 2005). In our study, we determined the expression and functional role of Sox4b in the specification of endocrine cell types during anterior pituitary development in zebrafish.

Code de champ modifié

We observed *sox4b*-expressing cells in a domain located in the pituitary placode at early stages (24hpf) and in the directly adjacent ventral diencephalon. At 30hpf, *sox4b* expression covers most of the *lim3*-expressing domain (Fig.1), confirming that *sox4b* is expressed in pituitary precursor cells. At later stages (48hpf), *sox4b* mRNA is detected in the entire forebrain and a clear signal is detected in the pituitary region expressing *tshβ* (Fig.1), *gsua* and the transcription factor *gata2a*. All these observations confirm that Sox4b is expressed in pituitary cells in zebrafish, consistent with its recently described expression in human fetal pituitary (Ma, Qi et al. 2009).

Code de champ modifié

Loss of function studies using morpholino knock-down or expression of a dominant-negative Sox4 mutant allowed us to uncover a key role for Sox4b in pituitary cell fate specification. Loss of Sox4b function results in dramatic reduction of *gsua*, *tshβ*, *lhβ* and *fshβ* expression and a moderate decrease in *gh* expression, while other pituitary markers are not significantly affected at 48hpf, indicating that *sox4b* expression is mainly required for differentiation of the specific *gsua*-expressing lineage giving rise to thyrotrope and gonadotrope cells during pituitary development.

Sox4b does not affect expression of the pituitary transcription factors Pit1 and Lim3, however it is required for expression of the zinc finger transcription factor Gata2a specifically in the zebrafish developing pituitary. The function of Gata2 was intensely studied in the hematopoietic tissues for proliferation and survival of hematopoietic stem cells (Shimizu and Yamamoto 2005). A function in urogenital development (Zhou, Lim et al. 1998) and in adipocyte (Tong, Tsai et al. 2005) and

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

## Résultat

endothelial cell (Minami, Murakami et al. 2004) differentiation was also described. In mouse, *Gata2* expression was shown in thyrotropes and gonadotropes starting at E10.5 (Dasen, O'Connell et al. 1999) and transfection studies in cell cultures revealed that *Gata2* activates the *Tsh $\beta$*  promoter through a synergistic action with *Pit1* in thyrotropes (Gordon, Lewis et al. 1997). *Gata* factors also stimulate the *Gsua* promoter in mouse gonadotrope cells (Steger, Hecht et al. 1994). Recently, a mouse Cre-Lox KO model was generated where *Gata2* gene disruption specifically in *Gsua*-expressing cells decreased the number of thyrotropes and gonadotropes at birth and severely reduced *Tsh*, *Lh* and *Fsh* expression in the adult (Charles, Saunders et al. 2006).

In zebrafish, *gata2a* transcripts are detected in the ventral ectoderm at 75% epiboly and in the yolk syncytial layer at 90% epiboly (Detrich, Kieran et al. 1995), later it is expressed in hematopoietic tissues and the central nervous system (Meng, Tang et al. 1997). Similar to mouse, *Gata2a* can modify the expression of specific genes in erythrocytes (Galloway, Wingert et al. 2005). In the developing pituitary, we found *gata2a* expression to be highly overlapping with that of *sox4b* and *gsua*, indicating a close relationship between *gata2a* and the *gsua* cell lineage. We also found that *gata2a* is expressed in all *tsh $\beta$* -expressing cells at 48hpf. When we investigated hormone expression in *gata2a* morphants, we indeed observed a drastic decrease of *tsh $\beta$*  and *gsua* expression at 48hpf and of gonadotropins at 4dpf. These results are consistent with those previously described in the conditional KO mouse model (Charles, Saunders et al. 2006). However, the defects observed in zebrafish appear to be much stronger than those reported in mouse; the number of thyrotrope and gonadotrope cells was lower at birth but recovered in the adult, while *Tsh*, *Lh* and *Fsh* expression remained severely reduced in the adult. Thus, in the mouse pituitary, *Gata2* appears to be dispensable for initial gonadotrope and thyrotrope cell fate determination, but important for expansion of the cell lineage during embryogenesis and for optimal gonadotrope and thyrotrope function in the adult. Unfortunately, no data are available concerning *Tsh $\beta$* , *Lh $\beta$*  and *Fsh $\beta$*  expression at early stages of the conditional KO mouse pituitary development, thus it remains unclear whether the *Gata2* depletion in mouse leads to a drastic delay of thyrotrope and gonadotrope differentiation or whether the recovery in cell number results from a compensatory mechanism, such as the reported up-regulation of *Gata3* expression in *Gata2* deficient mice (Charles, Saunders et al. 2006).

Code de champ modifié

Interestingly, the *sox4b* and *gata2a* genes in zebrafish display similar characteristics: both are co-expressed in the same pituitary precursor cells also expressing *gsua* and both are involved in thyrotrope and gonadotrope differentiation. We further showed that *sox4b* knock-down led to decreased expression of *gata2a* in the pituitary, suggesting that Sox4b activates *gata2a* expression. We confirmed this hypothesis by demonstrating that exogenous Gata2a expression can compensate for the lack of Sox4b function in *tsh $\beta$*  and *gsua* cell differentiation in *sox4b* morphants. Our *in situ* experiments show that *sox4b* is expressed at later stages (48 hpf) in the hypothalamus of the developing zebrafish, thus an indirect effect of hypothalamic signaling on pituitary *gata2* expression can be envisaged. However, although we cannot completely rule out a role of hypothalamic Sox4b, the perfect co-expression of *sox4b* and *gata2a* in *gsua*-expressing cells argues in favor of a cell autonomous regulation of *gata2a* expression by the Sox4b transcription factor.

We show that the expression of the pan-pituitary marker *lim3* is unchanged in *sox4b* knock-down embryos, indicating that the number of pituitary-specified cells remains unaltered while their capacity to terminally differentiate is affected. Furthermore, thyrotrope cells depend on the transcription factor Pit1 for their differentiation. Our results clearly show that *pit1* expression is not affected in *sox4b* morphants and, conversely, that *sox4b* and *gata2a* expression is not affected in *pit1* mutants. Thus, the *sox4b/gata2a* cascade acts independently of Pit1 to promote *gsua* and *tsh $\beta$*  expression in the *pit1*-expressing thyrotropes, consistent with the synergistic activation of the *Tsh $\beta$*  promoter that was described in mouse (42).

Another cell lineage that is affected in the *sox4b* morphants is the somatotropes expressing *gh*. Although less affected than the thyrotrope and gonadotrope cells, a clear decrease in *gh* expression was observed in the *sox4b* morphants in zebrafish. In the conditional *Gata2* KO mouse model, Gh expression was normal at birth, while a transient growth retardation was observed in males between weeks 3 and 9 (Charles, Saunders et al. 2006). In this model, *Gata2* gene depletion is obtained by expressing the CRE recombinase in *Gsua*-expressing cells, thus the somatotrope cells are presumably *Gata2* positive. However, no Gata2 expression was observed in mouse somatotropes and we show also here no colocalization of *gata2a* and *gh* mRNA in zebrafish, indicating that the effect of Sox4b or Gata2a depletion on *gh* expression might be cell non-autonomous, through altering the numbers or

Code de champ modifié

properties of other cell types. The precise significance and mechanism of the Sox4b/Gata2a regulatory cascade on GH expression will require further investigation.

Numerous reports have been published on Fsh and Lh in teleosts. Both hormones are synthesized in gonadotrope cells in two separate populations exhibiting distinct patterns of distribution in the zebrafish pituitary (So, Kwok et al. 2005). Their expression is low in zebrafish larvae and was only detectable by RT-PCR at 72hpf (Nica, Herzog et al. 2006), while sexual differentiation of the gonads was shown to start in three weeks old juveniles (Uchida, Yamashita et al. 2002). Using the more sensitive fluorescent *in situ* hybridization, we were able to observe several *lhβ*-positive cells at 72hpf in control embryos and observed a clear decrease in the number of these cells in *sox4b* morphants. qRT-PCR analysis further confirmed the decreased expression of both *lhβ* and *fshβ*, consistent with previous studies in mammalian cell culture revealing the activation of the gonadotropin subunit genes *Gsua* (Steger, Hecht et al. 1994) and *Lhβ* (Lo, Zheng et al. 2011) by Gata factors. Our results clearly show that the Sox4b and Gata2a factors are required for formation of *lhβ*- and *fshβ*-expressing cells in developing zebrafish, thus they represent to date the only factors specifically involved in gonadotrope cell differentiation in zebrafish.

Recently, induction of *SOX4* expression by TGFβ1 was shown in the human HP75 cell line derived from a silent gonadotropinoma (Ruebel, Leontovich et al. 2008), suggesting that *Sox4* genes could be targets for TGFβ/BMP signaling pathways. The TGFβ family member activin is known to activate gonadotropin expression in the adult pituitary, while inhibin represses this effect (Bilezikjian, Justice et al. 2012). A function for activin in maintaining cellular homeostasis within the pituitary was also proposed. During pituitary development in the mouse, a crucial role was demonstrated for BMPs, also belonging to the TGFβ family. BMP4 is required early for formation of the Rathke's pouch and thus for development of the entire pituitary, while BMP2 exerts a ventralizing effect within the developing Rathke's pouch, thus favoring the formation of *e.g.* gonadotropes (Zhu, Gleiberman et al. 2007). These observations are consistent with a role for Sox4b in the transduction of TGFβ signaling at least in gonadotropes, however, in zebrafish, manipulation of BMP signaling failed to cause any defect in pituitary development (Pogoda and Hammerschmidt 2009). Thus, at present, the relationship between Sox4 factors and TGFβ signaling remains an open question.

Code de champ modifié

## Résultat

Taken together, our results show that the Sry- related HMG-box transcription factor Sox4b is involved in the differentiation of thyrotrope and gonadotrope cells and that this function is mediated by specifically activating *gata2a* expression in *gsua*- expressing pituitary precursor cells.

**Acknowledgements**

This work was supported by the "Fonds de la Recherche Fondamentale Collective"; 2.4555.99/2.4561.10 the SSTC; PAI: P5/35 and the University of Liège; GAME project, and by FRFC grant 2.4542.00 and the Special Fund for Research to P.M. M.L. held a fellowship from the CGRI and SSTC, YQ was supported by EC and the Walloon Region (Alma-in-Silico) and M.M. is a "Chercheur Qualifié du F.N.R.S." We wish to thank the GIGA-R zebrafish facility for providing zebrafish adults and fertilized eggs and the GIGA-R GenoTranscriptomics platform for DNA sequencing and RNA quality control.

**Annexes****Table 2**

Individual embryos, injected with coMO or *sox4b*MO2, were optically analyzed and compared as in Table 1 at 48hpf. \*\*\*significant at  $p < 0,001$

Embryos 48hpf	coMo 2ng normal	<i>sox4b</i> MO2 2ng absence	<i>sox4b</i> MO2 2ng decrease
<i>Gsua</i>	25/25	5/25***	20/25***
<i>Tsh<math>\beta</math></i>	25/25	0/20	20/25***
<i>Gh</i>	25/25	15/25***	10/25***
<i>Prl</i>	25/25	0/25	0/25

**Table 3. List of primers used for RT-PCR.**

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Tsh<math>\beta</math></i>	5'-CTGTCAACACCACCATCTGC-3'	5'-GTGCATCCCCTCTGAACAAT-3'
<i>Gsua</i>	5'-TCACATCAGAAGCCACTTGC-3'	5'-GTGGCAGTCTGTGTGGTTGT-3'
<i>lim3</i>	5'-AGGAGGACGGCATGGACA-3'	5'-ATCGGACATGGGCGGC-3'
<i>efla</i>	5'-ACATGCTGGAGGCCAGCTC-3'	5'-TACCCTCCTTGCCTCAATC-3'
<i>Pomc</i>	5'-AGCTCAGTGTGGGAAAACG-3'	5'-GGTAGACGGGGTTTCATCT-3'
<i>Prl</i>	5'-ATGACAAAGACCAAGCCATG-3'	5'-GTTCTGGATGTGCCAGACTG-3'
<i>Gh</i>	5'-CCTCTGTCGTTCTGCAACTC-3'	5'-ACTCCAGGATTCAATGAGG-3'
<i>Sl<math>\beta</math></i>	5'-GTATATTCCTGGAGGGGCTG-3'	5'-ATTCACCAATGGCTCAATCC-3'
<i>Lh<math>\beta</math></i>	5'-GCAGAGACACTTACAACAGCC-3'	5'-AAAACCAAGCTCTGGAGCAGCC-3'
<i>Fsh<math>\beta</math></i>	5'-CTGCAGATGAGGATGCGTGTGC-3'	5'-CTATGCTGGACAATGGATCG-3'

### III. Discussion Générale et Perspectives

#### 3.1 Un type cellulaire gonadotrope dans l'hypophyse chez le zebrafish

Chez le zebrafish, différents gènes hormonaux comme *gh*, *prl*, *tsh*, *pomc* ont été bien caractérisés en termes de profil d'expression au cours du développement embryonnaire (Herzog, Zeng et al. 2003, Liu, Huang et al. 2003, Sbrogna, Barresi et al. 2003, Liu, Xia et al. 2006). Cependant, on sait peu sur l'expression des sous-unités *lhβ* et *fshβ* au cours du développement de l'hypophyse, c'est pourquoi nous avons tenté de caractériser leur profil d'expression pendant le développement embryonnaire.

La présente étude décrit la localisation et le profil d'expression de *lhβ* dans l'hypophyse antérieure chez le zebrafish, largement avant la différenciation et la maturation sexuelle. De nombreuses études ont été réalisées pour examiner et comprendre l'ontogenèse et les rôles différentiels de l'expression des sous-unités Fsh et Lh chez les poissons. Les deux gonadotropines *lhβ* et *fshβ* sont synthétisées dans des cellules différentes de l'hypophyse chez le zebrafish (So, Kwok et al. 2005), de manière semblable à d'autres espèces de téléostéens tels que la truite arc-en-ciel (Nozaki, Naito et al. 1990)(Naito et al. 1991), le tilapia (Parhar, Soga et al. 2003, Pandolfi, Lo Nostro et al. 2006) et la dorade (Garcia Ayala, Villaplana et al. 2003).

Dans la présente étude, nous avons examiné le profil d'expression de l'hormone gonadotropine *lhβ* par hybridation *in situ* dans les embryons et larves de zebrafish. L'expression de *lhβ* est observée à partir de 3dpf pendant la période embryonnaire, bien avant la différenciation sexuelle (25-30 jours) (Wang et al. 2007). Le nombre de cellules est inférieur en comparaison avec d'autres cellules hypophysaires, avec un signal mRNA détectable dans +/- 3-5 cellules isolées. La comparaison avec les autres gènes hormonaux montre que *lhβ* est exprimé dans la pPD de l'hypophyse. En effet, l'ARNm *lhβ* est localisé dans la partie comprenant les cellules qui expriment *tshβ*, *gh* ou *slβ*, et postérieure par rapport aux cellules qui expriment *prl*. Les cellules *lhβ* sont différentes des autres cellules hormonales, mais représentent une partie des cellules exprimant la sous-unité *gsua*. Les cellules *lhβ* sont aussi différentes des cellules *fshβ* comme montré précédemment (So, Kwok et al. 2005, Chen and Ge 2012). Finalement, plus tard, les cellules encore isolées à 4dpf s'assemblent pour finir en amas à 5 jours.

D'un autre côté, le stade auquel apparaît l'expression de *lhβ* et *fsh* dans l'hypophyse au cours du développement semble être spécifique pour chaque espèce de poisson. En effet, une tendance similaire se retrouve dans le pejerrey, les cellules *lhβ* apparaissent avant les cellules *fshβ* dans l'hypophyse (Miranda, Strussmann et al. 2001). Au contraire, l'analyse immunohistochimique dans la truite a montré que les cellules *fshβ* apparaissent plus tôt que les cellules *lhβ*, qui commencent seulement à se présenter au moment de la vitellogenèse ou de la spermatogénèse (Nozaki, Naito et al. 1990, Saga,

Oota et al. 1993), de même dans la *dorade royale*, les *cichlidés* et *solea senegalensis* (Garcia Ayala, Villaplana et al. 2003, Pandolfi, Lo Nostro et al. 2006, Guzman, Bayarri et al. 2009).

Au cours de notre travail, alors que les ARNm *lhβ* ont été détectés clairement dans plusieurs cellules à partir de 3dpf, nous avons réussi une seule fois à observer l'ARN *fshβ*, dans une seule cellule et à 96hpf (non montré). Malgré l'utilisation de nombreuses conditions pour tenter d'améliorer la technique d'hybridation *in situ* fluorescente, nous n'avons pas pu reproduire ce résultat; il doit donc être confirmé. Une alternative à l'hybridation *in situ* serait de réaliser une immunofluorescence afin de marquer la protéine, cependant nous ne disposons pas d'un anticorps reconnaissant la Fsh à ce jour.

L'expression précoce de *lhβ* suggère que cette hormone pourrait jouer un rôle pendant ces premiers stades du développement, bien avant la différenciation sexuelle. Une question intéressante pour des études futures serait d'étudier son rôle potentiel pendant le développement embryonnaire, on ne peut pas exclure la possibilité que Lh puisse être impliquée dans une fonction non reproductrice au début du développement. En conclusion nous avons caractérisé une lignée cellulaire gonadotrope hypophysaire qui exprime Lh, différente de celle exprimant Fsh. Enfin, pour compléter la liste des types cellulaires hypophysaires chez le zebrafish, une analyse détaillée du profil d'expression de la Fsh serait évidemment intéressante.

### 3.2 Fonction du facteur Sox4b dans le développement de l'hypophyse

L'étude du gène *sox4b* fait suite à la thèse de Mauricio Lopez, pendant laquelle il avait obtenu des résultats préliminaires suggérant, par hybridation *in situ*, que *sox4b* serait exprimé dans l'hypophyse et que son absence causerait une diminution des cellules à *tshβ* et *gsua* dans l'hypophyse. Nous avons donc entrepris de confirmer ces résultats et de détailler plus précisément la fonction du facteur de transcription Sox4b, nous servant de l'efficacité de MO*sox4b* (Mavropoulos, Devos et al. 2005), dans la cascade régulatrice contrôlant l'organogenèse de l'hypophyse antérieure.

Afin de mieux comprendre la fonction de ce facteur, nous avons d'abord déterminé son profil d'expression au sein de l'hypophyse. Nous avons observé une expression assez large, coïncidant avec celle du marqueur pan-hypophysaire *lim3*, à 30hpf, alors qu'à 48hpf cette expression se limite aux cellules *gsua*-positives, notamment les thyroïdotes. D'autre part, nous montrons que le facteur *sox4b* est requis pour la différenciation de la lignée hypophysaire *gsua*, en accord avec ce dernier domaine d'expression. Toutes ces données nous indiquent que l'activité de Sox4b est exprimée et limitée à la spécification et la différenciation terminales de certaines cellules de l'hypophyse.

Les données disponibles pour l'hypophyse chez la souris montrent que l'expression maximale de *Sox4* survient après E12, lorsque les cellules de l'hypophyse finissent par se différencier; par contre au stade d'adulte aucun ARNm *Sox4* n'a été détecté dans aucun des lobes hypophysaires (Ma, Qi et al. 2009). De même, cet auteur a montré que dans l'hypophyse humaine, l'expression de *SOX4* est présente

uniquement pendant le développement fœtal. Bien qu'aucune donnée fonctionnelle n'existe chez les mammifères, la comparaison de ces profils d'expression avec nos résultats suggère que la fonction du facteur de différenciation Sox4b dans l'hypophyse, que nous avons décrite chez le zebrafish, est conservée pour le facteur Sox4 chez la souris et l'humain.

Pendant notre travail, nous avons aussi pu montrer que la fonction principale de Sox4b dans l'hypophyse était d'activer l'expression d'un autre facteur de transcription, Gata2a. Auparavant, la seule fonction d'un facteur Gata2 connue chez le zebrafish était celle de réguler des gènes dans les cellules erythroïdes (Detrich, Kieran et al. 1995, Yang, Jiang et al. 2007, Pase, Layton et al. 2009, Liu, Yao et al. 2012, Liu, Bhang et al. 2013, Wang, Zhu et al. 2014). Le gène *Gata2* de mammifères présente deux homologues chez le zebrafish, les gènes *gata2a* et *gata2b*. Ce dernier est exprimé dans le cerveau postérieur et une partie des arcs branchiaux antérieurs juste derrière l'œil à 48hpf (Thisse 2004) (fig.20), alors que *gata2a* est exprimé dans les neurones du toit optique, la zone ventriculaire du cerveau postérieur, la vésicule optique, une partie des arcs branchiaux antérieurs vers 48hpf (fig.20) (Thisse 2005), mais aucune expression au niveau de l'hypophyse n'avait été rapportée. Dans notre étude, nous avons pu montrer que *gata2a* est exprimé dans une grande partie du télencéphale, du cervelet et régions adjacentes, ainsi que très clairement dans l'hypophyse où son expression se situe postérieurement par rapport aux cellules lactotropes dans la partie pPD où sont localisés les mRNA de *tshβ* et *gsua* (voir article). En plus, nous avons observé par hybridation *in situ* double fluorescence que *gsua* et *tshβ* colocalisent avec *gata2a* dans la région de l'adénohypophyse, dans les mêmes cellules qui synthétisent *sox4b*. Nos expériences ont montré que Gata2a joue le même rôle dans l'hypophyse que celui décrit pour Gata2 chez la souris, à savoir l'activation de l'expression de *tshβ* et *gsua*, c'est-à-dire qu'une absence de la fonction de Gata2a diminue la formation des cellules thyrotropes et gonadotropes.

Les souris knock-out pour les facteurs Gata présentent une forte mortalité embryonnaire en raison des anomalies dans la formation du tube cardiaque et dans le développement extra-embryonnaire (Tsai, Keller et al. 1994, Fujiwara, Browne et al. 1996, Molkentin and Olson 1997, Morrisey, Tang et al. 1998, Molkentin 2000). Le facteur Gata2 est essentiel pour l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive dans le sac vitellin et dans le foie ; les souris homozygotes (*Gata2*<sup>-/-</sup>) meurent au cours de l'embryogenèse à E10, 5 à cause d'une anémie sévère (Molkentin 2000). La souris KO ne peut donc pas être utilisée pour élucider le rôle de Gata2 dans l'hypophyse, car la période critique de développement de l'hypophyse commence à E9, lorsque les mutants commencent à mourir.

Néanmoins, Gata2 présente chez la souris un profil d'expression spatial et temporel qui suggère des rôles dans la différenciation des gonadotropes et des thyrotropes hypophysaires. Les ARNm et protéines Gata2 sont détectables dans l'hypophyse antérieure pendant le développement et chez l'adulte (Dasen and Rosenfeld 1999, Suh, Gage et al. 2002), ainsi que dans la plupart des adénomes humains TSH-positifs (Gordon, Lewis et al. 1997, Umeoka, Sanno et al. 2002). Gata2 lie et transactive le promoteur *gsua* (Steger, Hecht et al. 1994) et il agit en synergie avec Pit1 pour activer la transcription

du gène TSH  $\beta$ -unité (*Tsh $\beta$* ) (Dasen and Rosenfeld 1999, Gordon, Woodmansee et al. 2002). *Gata2* est génétiquement en aval du facteur de transcription *Pitx2*, et *Pitx2* peut activer directement la transcription du gène *Gata2* dans une culture de cellules (Suh, Gage et al. 2002). Finalement, la génération d'un modèle de souris KO conditionnel *Gata2* (référence) a révélé l'importance de *Gata2* pour la formation des cellules thyroïdes et gonadotropes chez la souris, en accord avec nos observations chez le zebrafish.

Chez le zebrafish, *sox4b* est requis pour l'expression de *gata2a*. L'expression de *gata2a* a disparu spécifiquement et complètement dans l'hypophyse dans les morphants *sox4b*. De plus, l'expression de *Gata2a* exogène est capable de rétablir l'expression de *tsh $\beta$*  et *gsua* dans les morphants *sox4b*. Ces résultats montrent que *Sox4b* est nécessaire pour l'expression de *gata2a* dans l'hypophyse, mais aussi que la fonction hypophysaire de *Sox4b* passe par l'activation de l'expression de *Gata2a*, pour induire la différenciation de cellules thyroïdes et gonadotropes.

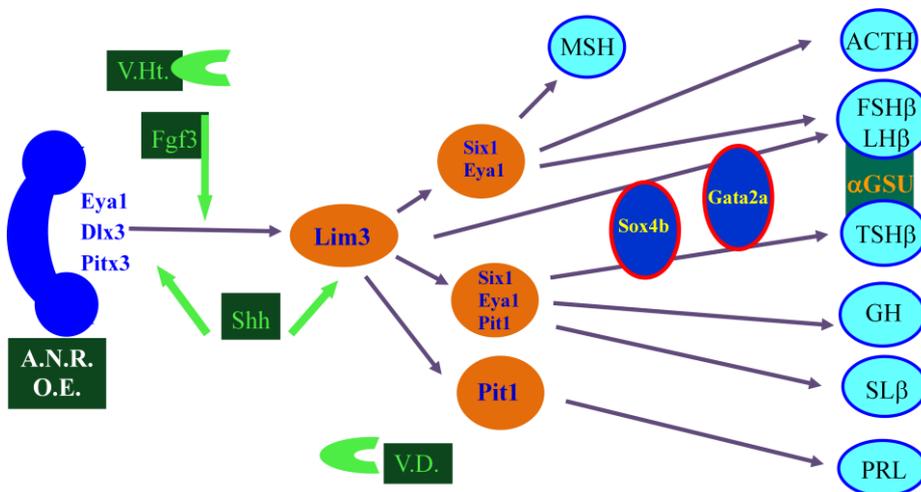
*Sox4b* est exprimé aussi dans l'hypothalamus vers 48hpf (voir article), alors un effet indirect de signaux hypothalamiques sur l'expression de *gata2a* dans l'hypophyse pourrait être envisagé. Cependant, la parfaite colocalisation des transcrits *sox4b* et *gata2a* dans les cellules que expriment *gsua* est un argument en faveur d'une régulation cellule-autonome de l'expression de *gata2a* par le facteur *Sox4b* ; en plus nous montrons que dans les embryons injectées avec *Mosox4b* l'expression du marqueur pan-hypophysaire *lim3* n'est pas affectée, indiquant que le nombre de cellules ne change pas, mais qu'elles sont affectées pendant la différenciation terminale.

Dans le zebrafish, *pit1* est un facteur présent dans les lignées cellulaires de l'adénohypophyse et sa présence est absolument nécessaire pour la différenciation des lactotropes, somatotropes, thyroïdes et somatolactotropes (Herzog, Sonntag et al. 2004, Lopez, Nica et al. 2006). Nos résultats montrent que l'expression de *pit1* ne change pas dans les morphants *sox4b* et, à l'inverse, l'expression des transcrits *sox4b* et *gata2a* n'est pas affectée dans le mutant *pit1* (voir article). Ces observations indiquent que *sox4b* et *gata2a* agissent indépendamment de *Pit1* pour promouvoir l'expression de *gsua* et *tsh $\beta$*  dans les thyroïdes, qui pourtant expriment *Pit1* probablement pour assurer l'activation synergique du promoteur *tsh $\beta$*  comme décrit chez la souris (Gordon, Lewis et al. 1997).

Une autre lignée affectée dans les morphants *sox4b* est celle des somatotropes, avec une diminution de l'expression de *gh*. Dans le modèle de souris Ko conditionnel *Gata2*, l'expression de *Gh* est normale à la naissance, mais les somatotropes présentent un retard dans leur développement entre 3 à 4 semaines (Charles, Saunders et al. 2006). Les transcrits *Gata2a* ne sont pas observés dans les somatotropes de souris, en accord avec nos observations dans le zebrafish. L'absence de colocalisation de *gata2a* ou *sox4b* avec *gh* indique que l'effet de diminution sur l'expression de *gh* dans le morphant *sox4b* est non autonome, indirectement due à l'altération du nombre ou des propriétés des autres types de cellules. L'effet de cette cascade régulatrice *sox4b/gata2a* sur l'expression de *gh* devra faire l'objet d'investigations futures.

Les expériences de knock-down *sox4b* ou *gata2a* avaient montré que la présence des mRNA *gsua* est réduite, voir complètement absente à 48hpf. Or, notre étude de l'apparition des gonadotropes a montré que les mRNA *lhβ* sont déjà observés à 3dpf et représentent une sous-population des cellules *gsua*-positives à 4dpf. De plus, nous avons montré par RT-PCR et par hybridation *in situ* que les injections de MO*sox4b* ou MO*gata2a* provoquent la diminution de *fshβ* et *lhβ* sur du RNA total des embryons de 4dpf. A 48 hpf, nous observons une parfaite superposition des cellules exprimant *gsua* avec celles exprimant *sox4b* et *gata2a*, par contre certaines de ces cellules n'expriment pas *tshβ*. Ces dernières pourraient représenter des précurseurs de gonadotropes. Toutes ces observations suggèrent que des précurseurs des gonadotropes sont déjà présents à 48hpf, qui expriment d'abord *gsua* seul avant d'entamer la différenciation plus tardive en activant les gènes *fshβ* and *lhβ* vers 72hpf.

L'ensemble de nos observations nous amène donc à proposer un modèle plus complet du développement de l'hypophyse chez le zebrafish. Le facteur Sox4b est exprimé d'abord dans l'hypophyse primordiale à 24hpf, pour ensuite restreindre son expression aux cellules de la lignée *gsua*. Dans ces cellules, ce facteur de transcription active l'expression de *gata2a*, permettant ainsi la formation des cellules thyroïdiques et gonadotropes. Par un mécanisme indirect, il contribue en plus à l'expression du gène *gh* dans les somatotropes (Fig. 18).



**Figure.18. Nouveau modèle de la cascade régulatrice des hormones pituitaires chez le zebrafish.**

Le facteur *Sox4b* est nécessaire pour l'expression de cellules thyroïdiques (Tshβ) et gonadotropes (Fshβ, Lhβ) avec la sous-unité commune Gsua, à travers l'expression du facteur *Gata2a*, mais indépendant du facteur *Pit1*.

Lors de notre étude, le knock down de *sox4b* n'a provoqué aucun défaut du système nerveux central (SNC), malgré la très forte expression de ce gène dans une grande partie du cerveau observée par hybridation *in situ*. Une explication possible de cette observation serait la redondance de Sox4b avec d'autres membres de la famille Sox C. Bhattaram et collaborateurs ont montré que des embryons de souris déficients ni en Sox4, ni en Sox11 ne manifestent des signes de développement anormal du système nerveux central jusqu'au temps de leur mort ; tenant compte du fait que les souris déficientes en Sox4 meurent déjà à 13,5 dpc (Schilham, Oosterwegel et al. 1996) quand le développement des oligodendrocytes vient de commencer (Bhattaram, Penzo-Mendez et al. 2010). Cependant, les deux facteurs de transcription Sox4 et Sox11 sont exprimés dans la lignée des oligodendrocytes jusqu'à ce que les cellules subissent une différenciation terminale (Patzner, Griffel et al. 2007). Les souris *Sox11*-déficientes présentent des défauts dans le cœur similaires à celles dépourvues de Sox4, mais moins prononcés, en plus d'autres problèmes de développement multiples. Les souris déficientes en *Sox12* (homologue de *SOX22* chez l'homme (Jay, Sahly et al. 1997)) autre gène du groupe C, ne présentent pas de malformations évidentes et jouissent d'une durée de vie et d'une fertilité normales (Schilham, Oosterwegel et al. 1996, Sock, Rettig et al. 2004, Hoser, Patzner et al. 2008, Wurm, Sock et al. 2008). Aucun knock out d'un gène du groupe C ne conduit donc à des défauts dans le SNC ou dans d'autres organes qui expriment fortement les 3 gènes. Il est ainsi tentant de spéculer que les trois gènes peuvent avoir des fonctions redondantes, et que ces fonctions ne seront révélées que par la génération de mutants multiples (Patzner, Griffel et al. 2007, Bhattaram, Penzo-Mendez et al. 2010, Penzo-Mendez 2010). Notons aussi que le gène *sox4a* chez le zebrafish est fortement exprimé dans le cerveau. Il serait intéressant de vérifier si d'autres membres de groupe SoxC sont exprimés et jouent un rôle chez le zebrafish, dans l'hypophyse ou ailleurs.



**Figure 19. WISH de *gata2b*, dans l'embryon de 48hpf.**  
Vue dorsale, antérieur à gauche (Thisse 2004).



**Figure 20.** *Wish de gata2a* dans l'embryon de 48hpf.  
Vue dorsale, anterieur à gauche (Thisse 2005).

## IV. Conclusions

Notre étude a contribué à une meilleure compréhension de l'organogenèse de l'hypophyse chez le zebrafish en caractérisant mieux la formation des cellules gonadotropes et en élucidant le rôle des facteurs de transcription *sox4b* et *gata2a* dans ces processus.

### 4.1 Concernant Lh :

- Nous avons déterminé par hybridation *in situ* la localisation du transcrit *lhβ*, qui se concentre uniquement dans l'adénohypophyse chez le zebrafish entre 3 et 5 jours.
- Nous avons observé que les cellules *lhβ* sont distribuées dans la zone médiane de la pPD, à la périphérie externe près de la PI, dans un nombre limité de cellules dans l'hypophyse.
- Par double hybridation *in situ* fluorescente, nous avons confirmé que l'ARNm *lhβ* colocalise avec ceux pour la sous-unité commune *gsua* dans la pPD à 3dpf, mais que des précurseurs exprimant uniquement *gsua* sont présents à 48hpf.
- A l'avenir, on pourrait mieux comprendre les mécanismes par lesquels des facteurs régulent l'expression de *lhβ*, et ainsi l'intervention d'autres facteurs dans l'organogenèse de l'hypophyse pourra être étudiée.

### 4.2 Concernant *sox4b* et *gata2a*

- Nous avons constaté que seulement *sox4b* est exprimé dans l'hypophyse, au contraire de son homologue *sox4a*.
- Le mRNA *sox4b* est détecté dans toute la région de la tête de l'embryon, y compris dans l'hypophyse à partir de 24hpf et à 48hpf.
- Le mRNA *sox4b* colocalise avec le marqueur pan-adenohypophysaire *lim3* au stade de 30hpf, ce qui confirme son expression dans les cellules précurseurs de l'hypophyse.
- Par des analyses au microscope confocal, nous avons montré une colocalisation de *sox4b* avec les cellules hypophysaires *gsua*- , *tshβ*- et *gata2a*-positives.
- L'absence de *sox4b* mène à une diminution drastique de l'expression de *tshβ*, *gsua*, *lhβ*, *fshβ* et à une légère diminution de *gh*, alors que d'autres marqueurs de la glande comme *pomc* ou *prl* ne sont pas affectés à 48hpf. Ces effets ont été montrés en utilisant deux morpholinos différents et en exprimant un mutant dominant-négatif pour Sox4, la spécificité pour Sox4b a été confirmée par des expériences de récupération après expression de Sox4b exogène.

- Dans les morphants *sox4b*, l'expression des facteurs de transcription hypophysaires *pit1* et *lim3* n'est pas modifiée. Réciproquement, l'expression de *sox4b* et *gata2a* ne change pas dans le mutant *pit1*, indiquant que leurs fonctions respectives sont indépendantes.
- Les modifications de l'expression des mRNA pour les hormones hypophysaires ont été confirmés par RT-PCR sur le RNA total extrait des embryons injectés avec MO*sox4b* de 48hpf.
- Par hybridation *in situ*, nous avons démontré que le gène *gata2a* est exprimé dans une grande partie du télencéphale, cervelet et régions adjacentes ainsi que très clairement dans l'hypophyse chez le zebrafish vers 48hpf.
- Le domaine d'expression de ce facteur se situe postérieurement par rapport aux cellules lactotropes; il se superpose parfaitement à ceux de *sox4b* et de *gsua*.
- Nous avons confirmé le rôle de *gata2a* dans le développement hypophysaire chez le zebrafish. L'injection de MO*gata2a* diminue l'expression des marqueurs hypophysaires *tshβ* et *gsua* à 48hpf, ainsi que celle des gonadotropines *lhβ* et *fshβ* à 3 dpf. Nous avons donc identifié le facteur Gata2a comme nécessaire pour la différenciation des thyrotropes et des gonadotropes.
- Finalement, nous avons montré que l'expression de Gata2a exogène dans les morphants *sox4b* permettait de récupérer les défauts engendrés, indiquant que la fonction de Sox4b réside dans l'induction de l'expression de Gata2a.
- Dans l'avenir, il serait intéressant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces facteurs se régulent (de manière directe ou indirecte) et par lesquels une modulation précise de l'expression de cellules thyrotropes et gonadotropes peut être réalisée ; et aussi de trouver d'autres facteurs qui pourraient intervenir dans l'expression des gonadotropes pendant l'organogenèse de l'hypophyse.

## V. REFERENCES

- Ahn, S. G., G. H. Cho, S. Y. Jeong, H. Rhim, J. Y. Choi and I. K. Kim (1999). "Identification of cDNAs for Sox-4, an HMG-Box protein, and a novel human homolog of yeast splicing factor SSF-1 differentially regulated during apoptosis induced by prostaglandin A2/delta12-PGJ2 in Hep3B cells." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1): 216-221.
- Alatzoglou, K. S., D. Kelberman and M. T. Dattani (2009). "The role of SOX proteins in normal pituitary development." *J Endocrinol* **200**(3): 245-258.
- Amsterdam, A., S. Burgess, G. Golling, W. Chen, Z. Sun, K. Townsend, S. Farrington, M. Haldi and N. Hopkins (1999). "A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish." *Genes Dev* **13**(20): 2713-2724.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian and R. Lovell-Badge (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." *Genes Dev* **17**(1): 126-140.
- Beis, D. and D. Y. Stainier (2006). "In vivo cell biology: following the zebrafish trend." *Trends Cell Biol* **16**(2): 105-112.
- Bhattaram, P., A. Penzo-Mendez, E. Sock, C. Colmenares, K. J. Kaneko, A. Vassilev, M. L. Depamphilis, M. Wegner and V. Lefebvre (2010). "Organogenesis relies on SoxC transcription factors for the survival of neural and mesenchymal progenitors." *Nat Commun* **1**: 9.
- Bilezikjian, L. M., N. J. Justice, A. N. Blackler, E. Wiater and W. W. Vale (2012). "Cell-type specific modulation of pituitary cells by activin, inhibin and follistatin." *Mol Cell Endocrinol*.
- Bouligand, J., C. Ghervan, J. A. Tello, S. Brailly-Tabard, S. Salenave, P. Chanson, M. Lombes, R. P. Millar, A. Guiochon-Mantel and J. Young (2009). "Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation." *N Engl J Med* **360**(26): 2742-2748.
- Bowles, J., G. Schepers and P. Koopman (2000). "Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators." *Dev Biol* **227**(2): 239-255.
- Busslinger, M. (2004). "Transcriptional control of early B cell development." *Annu Rev Immunol* **22**: 55-79.
- Calman, B., Y. W. Lin and R. A. Wallace (2001). "Preparation and use of specific antibodies to the beta-I and beta-II subunits of gonadotropic hormone from *Fundulus heteroclitus* pituitary." *Gen Comp Endocrinol* **123**(2): 203-209.
- Camper, S. A. (2004). "Sox3 and sexual dysfunction: it's in the head." *Nat Genet* **36**(3): 217-219.
- Chapman, S. C., A. L. Sawitzke, D. S. Campbell and G. C. Schoenwolf (2005). "A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish." *J Comp Neurol* **487**(4): 428-440.
- Charles, M. A., T. L. Saunders, W. M. Wood, K. Owens, A. F. Parlow, S. A. Camper, E. C. Ridgway and D. F. Gordon (2006). "Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function." *Mol Endocrinol* **20**(6): 1366-1377.
- Charles, M. A., T. L. Saunders, W. M. Wood, K. Owens, A. F. Parlow, S. A. Camper, E. C. Ridgway and D. F. Gordon (2006). "Pituitary specific Gata2 knockout: Effects on gonadotrope and thyrotrope function." *Mol Endocrinol*.
- Chen, J. Y. and M. J. Chiou (2010). "Molecular cloning and functional analysis of the zebrafish luteinizing hormone beta subunit (LH<beta>) promoter." *Fish Physiol Biochem* **36**(4): 1253-1262.
- Chen, W. and W. Ge (2012). "Ontogenic expression profiles of gonadotropins (fshb and lhb) and growth hormone (gh) during sexual differentiation and puberty onset in female zebrafish." *Biol Reprod* **86**(3): 73.
- Cheung, M., M. Abu-Elmagd, H. Clevers and P. J. Scotting (2000). "Roles of Sox4 in central nervous system development." *Brain Res Mol Brain Res* **79**(1-2): 180-191.
- Collignon, J., S. Sockanathan, A. Hacker, M. Cohen-Tannoudji, D. Norris, S. Rastan, M. Stevanovic, P. N. Goodfellow and R. Lovell-Badge (1996). "A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2." *Development* **122**(2): 509-520.
- Dahm, R. and R. Geisler (2006). "Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species." *Mar Biotechnol (NY)* **8**(4): 329-345.

- Dasen, J. S., S. M. O'Connell, S. E. Flynn, M. Treier, A. S. Gleiberman, D. P. Szeto, F. Hooshmand, A. K. Aggarwal and M. G. Rosenfeld (1999). "Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types." *Cell* **97**(5): 587-598.
- Dasen, J. S. and M. G. Rosenfeld (1999). "Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination." *Curr Opin Cell Biol* **11**(6): 669-677.
- Dasen, J. S. and M. G. Rosenfeld (2001). "Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development." *Annu Rev Neurosci* **24**: 327-355.
- Davis, S. W. and S. A. Camper (2007). "Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction." *Dev Biol* **305**(1): 145-160.
- de Moraes, D. C., M. Vaisman, F. L. Conceicao and T. M. Ortiga-Carvalho (2012). "Pituitary development: a complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors." *J Endocrinol* **215**(2): 239-245.
- Dee, C. T., C. S. Hirst, Y. H. Shih, V. B. Tripathi, R. K. Patient and P. J. Scotting (2008). "Sox3 regulates both neural fate and differentiation in the zebrafish ectoderm." *Dev Biol* **320**(1): 289-301.
- Detrich, H. W., 3rd, M. W. Kieran, F. Y. Chan, L. M. Barone, K. Yee, J. A. Rundstadler, S. Pratt, D. Ransom and L. I. Zon (1995). "Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23): 10713-10717.
- Devine, C. A., J. L. Sbrogna, B. Guner, M. Osgood, M. C. Shen and R. O. Karlstrom (2009). "A dynamic Gli code interprets Hh signals to regulate induction, patterning, and endocrine cell specification in the zebrafish pituitary." *Dev Biol* **326**(1): 143-154.
- Dong, C., D. Wilhelm and P. Koopman (2004). "Sox genes and cancer." *Cytogenet Genome Res* **105**(2-4): 442-447.
- Doyon, Y., J. M. McCammon, J. C. Miller, F. Faraji, C. Ngo, G. E. Katibah, R. Amora, T. D. Hocking, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov and S. L. Amacher (2008). "Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases." *Nat Biotechnol* **26**(6): 702-708.
- Driever, W., L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, S. C. Neuhauss, J. Malicki, D. L. Stemple, D. Y. Stainier, F. Zwartkruis, S. Abdelilah, Z. Rangini, J. Belak and C. Boggs (1996). "A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish." *Development* **123**: 37-46.
- Dutta, S., J. E. Dietrich, G. Aspöck, R. D. Burdine, A. Schier, M. Westerfield and Z. M. Varga (2005). "pitx3 defines an equivalence domain for lens and anterior pituitary placode." *Development* **132**(7): 1579-1590.
- Dutta, S., J. E. Dietrich, M. Westerfield and Z. M. Varga (2008). "Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary." *Dev Biol* **319**(2): 248-257.
- Dy, P., A. Penzo-Mendez, H. Wang, C. E. Pedraza, W. B. Macklin and V. Lefebvre (2008). "The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties." *Nucleic Acids Res* **36**(9): 3101-3117.
- Ekker, S. C., D. L. Stemple, M. Clark, C. B. Chien, R. S. Rasooly and L. C. Javois (2007). "Zebrafish genome project: bringing new biology to the vertebrate genome field." *Zebrafish* **4**(4): 239-251.
- Estrada, J. M., T. M. Buckey, K. D. Burman and O. P. Soldin (2013). "Thyrotropin Isoforms - Implications for Tsh Analysis and Clinical Practice." *Thyroid*.
- Fantes, J., N. K. Ragge, S. A. Lynch, N. I. McGill, J. R. Collin, P. N. Howard-Peebles, C. Hayward, A. J. Vivian, K. Williamson, V. van Heyningen and D. R. FitzPatrick (2003). "Mutations in SOX2 cause anophthalmia." *Nat Genet* **33**(4): 461-463.
- Fauquier, T., K. Rizzoti, M. Dattani, R. Lovell-Badge and I. C. Robinson (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**(8): 2907-2912.
- Friedman, R. S., C. S. Bangur, E. J. Zasloff, L. Fan, T. Wang, Y. Watanabe and M. Kalos (2004). "Molecular and immunological evaluation of the transcription factor SOX-4 as a lung tumor vaccine antigen." *J Immunol* **172**(5): 3319-3327.
- Fujiwara, Y., C. P. Browne, K. Cunniff, S. C. Goff and S. H. Orkin (1996). "Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12355-12358.
- Fuxa, M. and J. A. Skok (2007). "Transcriptional regulation in early B cell development." *Curr Opin Immunol* **19**(2): 129-136.

- Galloway, J. L., R. A. Wingert, C. Thisse, B. Thisse and L. I. Zon (2005). "Loss of *gata1* but not *gata2* converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos." *Dev. Cell* **8**(1): 109-116.
- Gamble, K. L., D. Resuehr and C. H. Johnson (2013). "Shift work and circadian dysregulation of reproduction." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 92.
- Garcia Ayala, A., M. Villaplana, M. P. Garcia Hernandez, E. Chaves Pozo and B. Agulleiro (2003). "FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study." *Gen Comp Endocrinol* **134**(1): 72-79.
- Geijsen, N., I. J. Uings, C. Pals, J. Armstrong, M. McKinnon, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers, L. Koenderman and P. J. Coffey (2001). "Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5Ralpha interacting protein." *Science* **293**(5532): 1136-1138.
- Gharib, S. D., M. E. Wierman, M. A. Shupnik and W. W. Chin (1990). "Molecular biology of the pituitary gonadotropins." *Endocr Rev* **11**(1): 177-199.
- Glasgow, E., A. A. Karavanov and I. B. Dawid (1997). "Neuronal and neuroendocrine expression of *lim3*, a LIM class homeobox gene, is altered in mutant zebrafish with axial signaling defects." *Dev Biol* **192**(2): 405-419.
- Glasgow, E., A. A. Karavanov and I. B. Dawid (1997). "Neuronal and neuroendocrine expression of *lim3*, a LIM class homeobox gene, is altered in mutant zebrafish with axial signaling defects." *Dev Biol* **192**(2): 405-419.
- Goldsmith, P. C., W. G. McGregor, W. J. Raymoure, R. W. Kuhn and R. B. Jaffe (1983). "Cellular localization of chorionic gonadotropin in human fetal kidney and liver." *J Clin Endocrinol Metab* **57**(3): 654-661.
- Gordon, D. F., S. R. Lewis, B. R. Haugen, R. A. James, M. T. McDermott, W. M. Wood and E. C. Ridgway (1997). "Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter." *J Biol Chem* **272**(39): 24339-24347.
- Gordon, D. F., S. R. Lewis, B. R. Haugen, R. A. James, M. T. McDermott, W. M. Wood and E. C. Ridgway (1997). "Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter." *J Biol Chem* **272**(39): 24339-24347.
- Gordon, D. F., W. W. Woodmansee, J. N. Black, J. M. Dowding, J. Bendrick-Peart, W. M. Wood and E. C. Ridgway (2002). "Domains of Pit-1 required for transcriptional synergy with GATA-2 on the TSH beta gene." *Mol Cell Endocrinol* **196**(1-2): 53-66.
- Graham, J. D., S. M. Hunt, N. Tran and C. L. Clarke (1999). "Regulation of the expression and activity by progestins of a member of the SOX gene family of transcriptional modulators." *J Mol Endocrinol* **22**(3): 295-304.
- Gribble, S. L., H. S. Kim, J. Bonner, X. Wang and R. I. Dorsky (2009). "Tcf3 inhibits spinal cord neurogenesis by regulating *sox4a* expression." *Development* **136**(5): 781-789.
- Guner, B., A. T. Ozacar, J. E. Thomas and R. O. Karlstrom (2008). "Graded hedgehog and fibroblast growth factor signaling independently regulate pituitary cell fates and help establish the pars distalis and pars intermedia of the zebrafish adenohypophysis." *Endocrinology* **149**(9): 4435-4451.
- Guzman, J. M., M. J. Bayarri, J. Ramos, Y. Zohar, C. Sarasquete and E. L. Mananos (2009). "Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (*Solea senegalensis*)." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **154**(1): 37-43.
- Haffter, P. and C. Nusslein-Volhard (1996). "Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish." *Int J Dev Biol* **40**(1): 221-227.
- Hamel, B. C., A. P. Smits, B. J. Otten, B. van den Helm, H. H. Ropers and E. C. Mariman (1996). "Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings." *Am J Med Genet* **64**(1): 35-41.
- Hammerschmidt, M., A. Brook and A. P. McMahon (1997). "The world according to hedgehog." *Trends Genet* **13**(1): 14-21.
- Han, X., P. J. Boyd, S. Colgan, J. A. Madri and T. L. Haas (2003). "Transcriptional up-regulation of endothelial cell matrix metalloproteinase-2 in response to extracellular cues involves GATA-2." *J Biol Chem* **278**(48): 47785-47791.
- Hardy, R. R. and K. Hayakawa (2001). "B cell development pathways." *Annu Rev Immunol* **19**: 595-621.
- Hauptmann, G. and T. Gerster (1994). "Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and *Drosophila* embryos." *Trends Genet* **10**(8): 266.

- Heicklen-Klein, A., L. J. McReynolds and T. Evans (2005). "Using the zebrafish model to study GATA transcription factors." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 95-106.
- Herzog, W., C. Sonntag, S. von der Hardt, H. H. Roehl, Z. M. Varga and M. Hammerschmidt (2004). "Fgf3 signaling from the ventral diencephalon is required for early specification and subsequent survival of the zebrafish adenohypophysis." Development **131**(15): 3681-3692.
- Herzog, W., C. Sonntag, B. Walderich, J. Odenthal, H. M. Maischein and M. Hammerschmidt (2004). "Genetic analysis of adenohypophysis formation in zebrafish." Mol Endocrinol **18**(5): 1185-1195.
- Herzog, W., X. Zeng, Z. Lele, C. Sonntag, J. W. Ting, C. Y. Chang and M. Hammerschmidt (2003). "Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog." Dev. Biol **254**(1): 36-49.
- Herzog, W., X. Zeng, Z. Lele, C. Sonntag, J. W. Ting, C. Y. Chang and M. Hammerschmidt (2003). "Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog." Dev Biol **254**(1): 36-49.
- Hirai, J., M. Nishita, N. Nakao, T. R. Saito and M. Tanaka (2013). "Regulation of prolactin receptor gene expression in the rat choroid plexus via transcriptional activation of multiple first exons during postnatal development and lactation." Exp Anim **62**(1): 49-56.
- Hol, F. A., M. T. Schepens, S. E. van Beersum, E. Redolfi, M. Affer, P. Vezzoni, B. C. Hamel, P. S. Karnes, E. C. Mariman and I. Zucchi (2000). "Identification and characterization of an Xq26-q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes." Genomics **69**(2): 174-181.
- Hong, C. S. and J. P. Saint-Jeannet (2005). "Sox proteins and neural crest development." Semin Cell Dev Biol **16**(6): 694-703.
- Hoser, M., M. R. Potzner, J. M. Koch, M. R. Bosl, M. Wegner and E. Sock (2008). "Sox12 deletion in the mouse reveals nonreciprocal redundancy with the related Sox4 and Sox11 transcription factors." Mol Cell Biol **28**(15): 4675-4687.
- Hume, C. R., D. L. Bratt and E. C. Oesterle (2007). "Expression of LHX3 and SOX2 during mouse inner ear development." Gene Expr Patterns **7**(7): 798-807.
- Hunt, S. M. and C. L. Clarke (1999). "Expression and hormonal regulation of the Sox4 gene in mouse female reproductive tissues." Biol Reprod **61**(2): 476-481.
- Hur, W., H. Rhim, C. K. Jung, J. D. Kim, S. H. Bae, J. W. Jang, J. M. Yang, S. T. Oh, D. G. Kim, H. J. Wang, S. B. Lee and S. K. Yoon (2010). "SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro." Carcinogenesis **31**(7): 1298-1307.
- Ikeda, T., H. Kawaguchi, S. Kamekura, N. Ogata, Y. Mori, K. Nakamura, S. Ikegawa and U. I. Chung (2005). "Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation." J. Bone Miner Metab **23**(5): 337-340.
- Jay, P., I. Sahly, C. Goze, S. Taviaux, F. Poulat, G. Couly, M. Abitbol and P. Berta (1997). "SOX22 is a new member of the SOX gene family, mainly expressed in human nervous tissue." Hum Mol Genet **6**(7): 1069-1077.
- Kakizawa, S., T. Kaneko and T. Hirano (1996). "Elevation of plasma somatotactin concentrations during acidosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." J Exp Biol **199**(Pt 5): 1043-1051.
- Kakizawa, S., T. Kaneko and T. Hirano (1997). "Effects of hypothalamic factors on somatotactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout." Gen Comp Endocrinol **105**(1): 71-78.
- Kamachi, Y. and H. Kondoh (2013). "Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation." Development **140**(20): 4129-4144.
- Kamachi, Y., M. Uchikawa, J. Collignon, R. Lovell-Badge and H. Kondoh (1998). "Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction." Development **125**(13): 2521-2532.
- Kamachi, Y., M. Uchikawa and H. Kondoh (2000). "Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development." Trends Genet **16**(4): 182-187.
- Kaneko, T. (1996). "Cell biology of somatotactin." Int Rev Cytol **169**: 1-24.
- Kanki, Y., T. Kohro, S. Jiang, S. Tsutsumi, I. Mimura, J. Suehiro, Y. Wada, Y. Ohta, S. Ihara, H. Iwanari, M. Naito, T. Hamakubo, H. Aburatani, T. Kodama and T. Minami (2011). "Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression." EMBO J **30**(13): 2582-2595.

- Kelberman, D. and M. T. Dattani (2007). "Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology." *Eur J Endocrinol* **157** *Suppl 1*: S3-14.
- Kelberman, D. and M. T. Dattani (2008). "Septo-optic dysplasia - novel insights into the aetiology." *Horm Res* **69**(5): 257-265.
- Kelberman, D., S. C. de Castro, S. Huang, J. A. Crolla, R. Palmer, J. W. Gregory, D. Taylor, L. Cavallo, M. F. Faienza, R. Fischetto, J. C. Achermann, J. P. Martinez-Barbera, K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson, D. Gerrelli and M. T. Dattani (2008). "SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(5): 1865-1873.
- Kelberman, D., K. Rizzoti, A. Avilion, M. Bitner-Glindzicz, S. Cianfarani, J. Collins, W. K. Chong, J. M. Kirk, J. C. Achermann, R. Ross, D. Carmignac, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson and M. T. Dattani (2006). "Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans." *J Clin Invest* **116**(9): 2442-2455.
- Kelberman, D., K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson and M. T. Dattani (2009). "Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse." *Endocr Rev* **30**(7): 790-829.
- Kiefer, J. C. (2007). "Back to basics: Sox genes." *Dev Dyn* **236**(8): 2356-2366.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.
- Kondoh, H., M. Uchikawa and Y. Kamachi (2004). "Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation." *Int J. Dev. Biol* **48**(8-9): 819-827.
- Lagerstrom-Fermer, M., M. Sundvall, E. Johnsen, G. L. Warne, S. M. Forrest, J. D. Zajac, A. Rickards, D. Ravine, U. Landegren and U. Pettersson (1997). "X-linked recessive panhypopituitarism associated with a regional duplication in Xq25-q26." *Am J Hum Genet* **60**(4): 910-916.
- Lang, R. A. (2004). "Pathways regulating lens induction in the mouse." *Int J. Dev. Biol* **48**(8-9): 783-791.
- Laudet, V., D. Stehelin and H. Clevers (1993). "Ancestry and diversity of the HMG box superfamily." *Nucleic Acids Res* **21**(10): 2493-2501.
- Laumonnier, F., N. Ronce, B. C. Hamel, P. Thomas, J. Lespinasse, M. Raynaud, C. Paringaux, H. Van Bokhoven, V. Kalscheuer, J. P. Fryns, J. Chelly, C. Moraine and S. Briault (2002). "Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency." *Am J. Hum Genet* **71**(6): 1450-1455.
- LaVoie, H. A. (2003). "The role of GATA in mammalian reproduction." *Exp Biol Med (Maywood)* **228**(11): 1282-1290.
- Lee, C. J., V. J. Appleby, A. T. Orme, W. I. Chan and P. J. Scotting (2002). "Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma." *J Neurooncol* **57**(3): 201-214.
- Lefebvre, V., B. Dumitriu, A. Penzo-Mendez, Y. Han and B. Pallavi (2007). "Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(12): 2195-2214.
- Levavi-Sivan, B., J. Bogerd, E. L. Mananos, A. Gomez and J. J. Lareyre (2010). "Perspectives on fish gonadotropins and their receptors." *Gen Comp Endocrinol* **165**(3): 412-437.
- Li, S., E. B. Crenshaw, 3rd, E. J. Rawson, D. M. Simmons, L. W. Swanson and M. G. Rosenfeld (1990). "Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1." *Nature* **347**(6293): 528-533.
- Li, X., K. A. Oghi, J. Zhang, A. Krones, K. T. Bush, C. K. Glass, S. K. Nigam, A. K. Aggarwal, R. Maas, D. W. Rose and M. G. Rosenfeld (2003). "Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis." *Nature* **426**(6964): 247-254.
- Liem, K. F., W.E. Bemis, W.F. Walker, Jr., and L. Grande. (2001 3era edition). "Functional anatomy of the vertebrates: An evolutionary Perspective." *Harcourt College Publishers, Orlando, FL*: 766pp.
- Liu, F., S. H. Bhang, E. Arentson, A. Sawada, C. K. Kim, I. Kang, J. Yu, N. Sakurai, S. H. Kim, J. J. Yoo, P. Kim, S. H. Pahng, Y. Xia, L. Solnica-Krezel and K. Choi (2013). "Enhanced hemangioblast generation and improved vascular repair and regeneration from embryonic stem cells by defined transcription factors." *Stem Cell Reports* **1**(2): 166-182.

- Liu, F., S. Yao, T. Zhang, C. Xiao, Y. Shang, J. Liu and X. Mo (2012). "Kzfp regulates the transcription of *gata2* and *pu.1* during primitive hematopoiesis in zebrafish embryos." J Genet Genomics **39**(9): 463-471.
- Liu, N. A., H. Huang, Z. Yang, W. Herzog, M. Hammerschmidt, S. Lin and S. Melmed (2003). "Pituitary corticotroph ontogeny and regulation in transgenic zebrafish." Mol Endocrinol **17**(5): 959-966.
- Liu, Y., X. Xia, J. D. Fondell and P. M. Yen (2006). "Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of coactivator recruitment and histone acetylation." Mol Endocrinol **20**(3): 483-490.
- Lo, A., W. Zheng, Y. Gong, J. R. Crochet and L. M. Halvorson (2011). "GATA transcription factors regulate LHBeta gene expression." J Mol Endocrinol **47**(1): 45-58.
- Lohr, H. and M. Hammerschmidt (2011). "Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease." Annu Rev Physiol **73**: 183-211.
- Lolait, S. J., L. Q. Stewart, J. A. Roper, G. Harrison, D. S. Jessop, W. S. Young, 3rd and A. M. O'Carroll (2007). "Attenuated stress response to acute lipopolysaccharide challenge and ethanol administration in vasopressin V1b receptor knockout mice." J Neuroendocrinol **19**(7): 543-551.
- Lopez, M., G. Nica, P. Motte, J. A. Martial, M. Hammerschmidt and M. Muller (2006). "Expression of the somatolactin beta gene during zebrafish embryonic development." Gene Expr Patterns **6**(2): 156-161.
- Lu, K., W. Wen, C. Li and S. Xie (1995). "Frequency dependence of electrorheological fluids in an electric field." Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics **52**(6): 6329-6332.
- Ma, Y., X. Qi, J. Du, S. Song, D. Feng, J. Qi, Z. Zhu, X. Zhang, H. Xiao, Z. Han and X. Hao (2009). "Identification of candidate genes for human pituitary development by EST analysis." BMC Genomics **10**: 109.
- Markkula, M., T. Hamalainen, E. Loune and I. Huhtaniemi (1995). "The follicle-stimulating hormone (FSH) beta- and common alpha-subunits are expressed in mouse testis, as determined in wild-type mice and those transgenic for the FSH beta-subunit/herpes simplex virus thymidine kinase fusion gene." Endocrinology **136**(11): 4769-4775.
- Markkula, M. and I. Huhtaniemi (1996). "Transgenic animals and gonadotrophins." Rev Reprod **1**(2): 97-106.
- Markkula, M., K. Kananen, P. Klemi and I. Huhtaniemi (1996). "Pituitary and ovarian expression of the endogenous follicle-stimulating hormone (FSH) subunit genes and an FSH beta-subunit promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase gene in transgenic mice; specific partial ablation of FSH-producing cells by antiherpes treatment." J Endocrinol **150**(2): 265-273.
- Mavropoulos, A., N. Devos, F. Biemar, E. Zecchin, F. Argenton, H. Edlund, P. Motte, J. A. Martial and B. Peers (2005). "sox4b is a key player of pancreatic alpha cell differentiation in zebrafish." Dev Biol **285**(1): 211-223.
- Mavropoulos, A., N. Devos, F. Biemar, E. Zecchin, F. Argenton, H. Edlund, P. Motte, J. A. Martial and B. Peers (2005). "sox4b is a key player of pancreatic alpha cell differentiation in zebrafish." Dev Biol **285**(1): 211-223.
- McCracken, S., C. S. Kim, Y. Xu, M. Minden and N. G. Miyamoto (1997). "An alternative pathway for expression of p56lck from type I promoter transcripts in colon carcinoma." Oncogene **15**(24): 2929-2937.
- Mehta, A. and M. T. Dattani (2008). "Developmental disorders of the hypothalamus and pituitary gland associated with congenital hypopituitarism." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **22**(1): 191-206.
- Meng, A., H. Tang, B. A. Ong, M. J. Farrell and S. Lin (1997). "Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6267-6272.
- Meng, Y. and B. L. Lin (2008). "A feed-forward artificial neural network for prediction of the aquatic ecotoxicity of alcohol ethoxylate." Ecotoxicol Environ Saf **71**(1): 172-186.
- Minami, T., T. Murakami, K. Horiuchi, M. Miura, T. Noguchi, J. Miyazaki, T. Hamakubo, W. C. Aird and T. Kodama (2004). "Interaction between hex and GATA transcription factors in vascular endothelial cells inhibits flk-1/KDR-mediated vascular endothelial growth factor signaling." J Biol Chem **279**(20): 20626-20635.

- Miranda, L. A., C. A. Strussmann and G. M. Somoza (2001). "Immunocytochemical identification of GtH1 and GtH2 cells during the temperature-sensitive period for sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*." *Gen Comp Endocrinol* **124**(1): 45-52.
- Molkentin, J. D. (2000). "The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression." *J Biol Chem* **275**(50): 38949-38952.
- Molkentin, J. D. and E. N. Olson (1997). "GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy?" *Circulation* **96**(11): 3833-3835.
- Morrissey, E. E., Z. Tang, K. Sigrist, M. M. Lu, F. Jiang, H. S. Ip and M. S. Parmacek (1998). "GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo." *Genes Dev* **12**(22): 3579-3590.
- Mullis, P. E. (2001). "Transcription factors in pituitary development." *Mol Cell Endocrinol* **185**(1-2): 1-16.
- Muto, A., M. B. Orger, A. M. Wehman, M. C. Smear, J. N. Kay, P. S. Page-McCaw, E. Gahtan, T. Xiao, L. M. Nevin, N. J. Gosse, W. Staub, K. Finger-Baier and H. Baier (2005). "Forward genetic analysis of visual behavior in zebrafish." *PLoS Genet* **1**(5): e66.
- Nagasawa, T. (2006). "Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development." *Nat Rev Immunol* **6**(2): 107-116.
- Nasevicius, A. and S. C. Ekker (2000). "Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish." *Nat Genet* **26**(2): 216-220.
- Nica, G., W. Herzog, C. Sonntag and M. Hammerschmidt (2004). "Zebrafish pit1 mutants lack three pituitary cell types and develop severe dwarfism." *Mol Endocrinol* **18**(5): 1196-1209.
- Nica, G., W. Herzog, C. Sonntag, M. Nowak, H. Schwarz, A. G. Zapata and M. Hammerschmidt (2006). "Eya1 is required for lineage-specific differentiation, but not for cell survival in the zebrafish adenohypophysis." *Dev Biol* **292**(1): 189-204.
- Nica, G., W. Herzog, C. Sonntag, M. Nowak, H. Schwarz, A. G. Zapata and M. Hammerschmidt (2006). "Eya1 is required for lineage-specific differentiation, but not for cell survival in the zebrafish adenohypophysis." *Dev. Biol* **292**(1): 189-204.
- Nissen-Meyer, L. S., R. Jemtland, V. T. Gautvik, M. E. Pedersen, R. Paro, D. Fortunati, D. D. Pierroz, V. A. Stadelmann, S. Reppe, F. P. Reinhold, A. Del Fattore, N. Rucci, A. Teti, S. Ferrari and K. M. Gautvik (2007). "Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice." *J Cell Sci* **120**(Pt 16): 2785-2795.
- Nozaki, M., N. Naito, P. Swanson, W. W. Dickhoff, Y. Nakai, K. Suzuki and H. Kawauchi (1990). "Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* irideus)." *Gen Comp Endocrinol* **77**(3): 358-367.
- Nusslein-Volhard, C. D., R. (2002). *zebrafish*.
- Ollier, S., X. Zhao and P. Lacasse (2013). "Effect of prolactin-release inhibition on milk production and mammary gland involution at drying-off in cows." *J Dairy Sci* **96**(1): 335-343.
- Pandolfi, M., F. L. Lo Nostro, A. Shimizu, A. G. Pozzi, F. J. Meijide, G. R. Vazquez and M. C. Maggese (2006). "Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation." *Anat Embryol (Berl)* **211**(5): 355-365.
- Parhar, I. S., S. Ogawa, T. Hamada and Y. Sakuma (2003). "Single-cell real-time quantitative polymerase chain reaction of immunofluorescently identified neurons of gonadotropin-releasing hormone subtypes in cichlid fish." *Endocrinology* **144**(8): 3297-3300.
- Parhar, I. S., T. Soga, S. Ogawa and Y. Sakuma (2003). "FSH and LH-beta subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost." *Gen Comp Endocrinol* **132**(3): 369-378.
- Pase, L., J. E. Layton, W. P. Kloosterman, D. Carradice, P. M. Waterhouse and G. J. Lieschke (2009). "miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2." *Blood* **113**(8): 1794-1804.
- Penberthy, W. T., C. Zhao, Y. Zhang, J. R. Jessen, Z. Yang, O. Bricaud, A. Collazo, A. Meng and S. Lin (2004). "Pur alpha and Sp8 as opposing regulators of neural gata2 expression." *Dev Biol* **275**(1): 225-234.
- Penzo-Mendez, A. I. (2010). "Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(3): 425-428.

- Perl, A. K., R. Kist, Z. Shan, G. Scherer and J. A. Whitsett (2005). "Normal lung development and function after Sox9 inactivation in the respiratory epithelium." *Genesis* **41**(1): 23-32.
- Pevny, L. and M. Placzek (2005). "SOX genes and neural progenitor identity." *Curr Opin Neurobiol* **15**(1): 7-13.
- Pevny, L. H. and R. Lovell-Badge (1997). "Sox genes find their feet." *Curr Opin Genet Dev* **7**(3): 338-344.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): 2002-2007.
- Pfaffle, R. W., G. E. DiMattia, J. S. Parks, M. R. Brown, J. M. Wit, M. Jansen, H. Van der Nat, J. L. Van den Brande, M. G. Rosenfeld and H. A. Ingraham (1992). "Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia." *Science* **257**(5073): 1118-1121.
- Pitteloud, N., A. Thambundit, A. A. Dwyer, J. L. Falardeau, L. Plummer, L. M. Caronia, F. J. Hayes, H. Lee, P. A. Boepple and W. F. Crowley, Jr. (2009). "Role of seminiferous tubular development in determining the FSH versus LH responsiveness to GnRH in early sexual maturation." *Neuroendocrinology* **90**(3): 260-268.
- Planas, J. V., P. Swanson, M. Rand-Weaver and W. W. Dickhoff (1992). "Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*." *Gen Comp Endocrinol* **87**(1): 1-5.
- Pogoda, H. M. and M. Hammerschmidt (2007). "Molecular genetics of pituitary development in zebrafish." *Semin Cell Dev Biol* **18**(4): 543-558.
- Pogoda, H. M. and M. Hammerschmidt (2009). "How to make a teleost adenohypophysis: molecular pathways of pituitary development in zebrafish." *Mol Cell Endocrinol* **312**(1-2): 2-13.
- Pogoda, H. M., N. Sternheim, D. A. Lyons, B. Diamond, T. A. Hawkins, I. G. Woods, D. H. Bhatt, C. Franzini-Armstrong, C. Dominguez, N. Arana, J. Jacobs, R. Nix, J. R. Fetcho and W. S. Talbot (2006). "A genetic screen identifies genes essential for development of myelinated axons in zebrafish." *Dev Biol* **298**(1): 118-131.
- Pogoda, H. M., S. von der Hardt, W. Herzog, C. Kramer, H. Schwarz and M. Hammerschmidt (2006). "The proneural gene *ascl1a* is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis." *Development* **133**(6): 1079-1089.
- Potzner, M. R., C. Griffel, E. Lutjen-Drecoll, M. R. Bosl, M. Wegner and E. Sock (2007). "Prolonged Sox4 expression in oligodendrocytes interferes with normal myelination in the central nervous system." *Mol Cell Biol* **27**(15): 5316-5326.
- Pramoonjago, P., A. S. Baras and C. A. Moskaluk (2006). "Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells." *Oncogene* **25**(41): 5626-5639.
- Racca, S., F. Piccione, A. Spaccamiglio, V. M. Carriero, S. De Francia, L. Cangemi, P. Esculapio, M. Papotti, G. Migliaretti, P. Portaleone, F. Di Carlo and G. Abbadessa (2012). "Effects of sub-chronic nandrolone administration on hormonal adaptive response to acute stress in rats." *Psychoneuroendocrinology* **37**(8): 1234-1247.
- Radovick, S., M. Nations, Y. Du, L. A. Berg, B. D. Weintraub and F. E. Wondisford (1992). "A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency." *Science* **257**(5073): 1115-1118.
- Rand-Weaver, M., P. Swanson, H. Kawachi and W. W. Dickhoff (1992). "Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon." *J Endocrinol* **133**(3): 393-403.
- Rhodes, S. J., G. E. DiMattia and M. G. Rosenfeld (1994). "Transcriptional mechanisms in anterior pituitary cell differentiation." *Curr Opin Genet Dev* **4**(5): 709-717.
- Rizzoti, K., S. Brunelli, D. Carmignac, P. Q. Thomas, I. C. Robinson and R. Lovell-Badge (2004). "SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis." *Nat Genet* **36**(3): 247-255.
- Rizzoti, K. and R. Lovell-Badge (2007). "SOX3 activity during pharyngeal segmentation is required for craniofacial morphogenesis." *Development* **134**(19): 3437-3448.
- Ruebel, K. H., A. A. Leontovich, L. Jin, G. A. Stilling, H. Zhang, X. Qian, N. Nakamura, B. W. Scheithauer, K. Kovacs and R. V. Lloyd (2006). "Patterns of gene expression in pituitary carcinomas and adenomas analyzed by high-density oligonucleotide arrays, reverse transcriptase-quantitative PCR, and protein expression." *Endocrine* **29**(3): 435-444.

- Ruebel, K. H., A. A. Leontovich, Y. Tanizaki, L. Jin, G. A. Stilling, S. Zhang, K. Coonse, B. W. Scheithauer, M. Lombardero, K. Kovacs and R. V. Lloyd (2008). "Effects of TGFbeta1 on gene expression in the HP75 human pituitary tumor cell line identified by gene expression profiling." *Endocrine* **33**(1): 62-76.
- Saga, T., Y. Oota, M. Nozaki and P. Swanson (1993). "Salmonid pituitary gonadotrophs. III. Chronological appearance of GTH I and other adenohypophysial hormones in the pituitary of the developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*)." *Gen Comp Endocrinol* **92**(2): 233-241.
- Sato, N., Y. Kamachi, H. Kondoh, Y. Shima, K. Morohashi, R. Horikawa and T. Ogata (2007). "Hypogonadotropic hypogonadism in an adult female with a heterozygous hypomorphic mutation of SOX2." *Eur J Endocrinol* **156**(2): 167-171.
- Sbrogna, J. L., M. J. Barresi and R. O. Karlstrom (2003). "Multiple roles for Hedgehog signaling in zebrafish pituitary development." *Dev Biol* **254**(1): 19-35.
- Schauerte, H. E., F. J. van Eeden, C. Fricke, J. Odenthal, U. Strahle and P. Haffter (1998). "Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish." *Development* **125**(15): 2983-2993.
- Schepers, G. E., R. D. Teasdale and P. Koopman (2002). "Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families." *Dev Cell* **3**(2): 167-170.
- Schilham, M. W., M. A. Oosterwegel, P. Moerer, J. Ya, P. A. de Boer, M. van de Wetering, S. Verbeek, W. H. Lamers, A. M. Kruisbeek, A. Cumano and H. Clevers (1996). "Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4." *Nature* **380**(6576): 711-714.
- Schlusser, G. (2005). "Evolutionary origins of vertebrate placodes: insights from developmental studies and from comparisons with other deuterostomes." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **304**(4): 347-399.
- Scully, K. M. and M. G. Rosenfeld (2002). "Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis." *Science* **295**(5563): 2231-2235.
- Seuntjens, E., H. Vankelecom, A. Quaegebeur, V. Vande Vijver and C. Denef (1999). "Targeted ablation of gonadotrophs in transgenic mice affects embryonic development of lactotrophs." *Mol Cell Endocrinol* **150**(1-2): 129-139.
- Shao, Y. T., M. Arvidsson, S. Trombley, R. W. Schulz, M. Schmitz and B. Borg (2013). "Androgen feedback effects on LH and FSH, and photoperiodic control of reproduction in male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*." *Gen Comp Endocrinol* **182**: 16-23.
- Sheng, H. Z., A. B. Zhadanov, B. Mosinger, Jr., T. Fujii, S. Bertuzzi, A. Grinberg, E. J. Lee, S. P. Huang, K. A. Mahon and H. Westphal (1996). "Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3." *Science* **272**(5264): 1004-1007.
- Shimizu, R. and M. Yamamoto (2005). "Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors." *Semin Cell Dev Biol* **16**(1): 129-136.
- Sivasubbu, S., D. Balciunas, A. Amsterdam and S. C. Ekker (2007). "Insertional mutagenesis strategies in zebrafish." *Genome Biol* **8 Suppl 1**: S9.
- Smits, P., P. Dy, S. Mitra and V. Lefebvre (2004). "Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate." *J. Cell Biol* **164**(5): 747-758.
- So, W. K., H. F. Kwok and W. Ge (2005). "Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity." *Biol Reprod* **72**(6): 1382-1396.
- Sock, E., S. D. Rettig, J. Enderich, M. R. Bosl, E. R. Tamm and M. Wegner (2004). "Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6635-6644.
- Solomon, N. M., S. Nouri, G. L. Warne, M. Lagerstrom-Fermer, S. M. Forrest and P. Q. Thomas (2002). "Increased gene dosage at Xq26-q27 is associated with X-linked hypopituitarism." *Genomics* **79**(4): 553-559.
- Solomon, N. M., S. A. Ross, T. Morgan, J. L. Belsky, F. A. Hol, P. S. Karnes, N. J. Hopwood, S. E. Myers, A. S. Tan, G. L. Warne, S. M. Forrest and P. Q. Thomas (2004). "Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3." *J. Med Genet* **41**(9): 669-678.

- Solomon, N. M., S. A. Ross, T. Morgan, J. L. Belsky, F. A. Hol, P. S. Karnes, N. J. Hopwood, S. E. Myers, A. S. Tan, G. L. Warne, S. M. Forrest and P. Q. Thomas (2004). "Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3." *J Med Genet* **41**(9): 669-678.
- Soullier, S., P. Jay, F. Poulat, J. M. Vanacker, P. Berta and V. Laudet (1999). "Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution." *J Mol Evol* **48**(5): 517-527.
- Steger, D. J., J. H. Hecht and P. L. Mellon (1994). "GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin alpha-subunit gene in the placenta and pituitary gland." *Mol Cell Biol* **14**(8): 5592-5602.
- Suh, H., P. J. Gage, J. Drouin and S. A. Camper (2002). "Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification." *Development* **129**(2): 329-337.
- Sun, B., S. Mallampati, Y. Gong, D. Wang, V. Lefebvre and X. Sun (2013). "Sox4 is required for the survival of pro-B cells." *J Immunol* **190**(5): 2080-2089.
- Swanson, P., Dickey J.T., Campbell (2003). "Biochemistry and physiology of fish gonadotropins." *B. Fish Physiol Biochem* **28**:53-59.
- Tatsumi, K., K. Miyai, T. Notomi, K. Kaibe, N. Amino, Y. Mizuno and H. Kohno (1992). "Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene." *Nat Genet* **1**(1): 56-58.
- Thein, D. C., J. M. Thalhammer, A. C. Hartwig, E. B. Crenshaw, 3rd, V. Lefebvre, M. Wegner and E. Sock (2010). "The closely related transcription factors Sox4 and Sox11 function as survival factors during spinal cord development." *J Neurochem* **115**(1): 131-141.
- Thisse, B., Thisse, C. (2004). "Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis." *ZFIN Direct Data Submission* (<http://zfin.org>).
- Thisse, C., and Thisse, B (2005). "High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones." *ZFIN Direct Data Submission* (<http://zfin.org>).
- Tong, Q., J. Tsai, G. Tan, G. Dalgin and G. S. Hotamisligil (2005). "Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation." *Mol Cell Biol* **25**(2): 706-715.
- Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, G. Levi, A. Trembleau, D. Gourdji, M. A. Driancourt, C. V. Rao and P. Charnay (1998). "Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice." *Mol Endocrinol* **12**(1): 107-122.
- Toro, S. and Z. M. Varga (2007). "Equivalent progenitor cells in the zebrafish anterior preplacodal field give rise to adenohypophysis, lens, and olfactory placodes." *Semin Cell Dev Biol* **18**(4): 534-542.
- Treier, M., S. O'Connell, A. Gleiberman, J. Price, D. P. Szeto, R. Burgess, P. T. Chuang, A. P. McMahon and M. G. Rosenfeld (2001). "Hedgehog signaling is required for pituitary gland development." *Development* **128**(3): 377-386.
- Tsai, F. Y., G. Keller, F. C. Kuo, M. Weiss, J. Chen, M. Rosenblatt, F. W. Alt and S. H. Orkin (1994). "An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2." *Nature* **371**(6494): 221-226.
- Tsai, F. Y. and S. H. Orkin (1997). "Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation." *Blood* **89**(10): 3636-3643.
- Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and T. Iguchi (2002). "Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish." *J Exp Biol* **205**(Pt 6): 711-718.
- Umeoka, K., N. Sanno, R. Y. Osamura and A. Teramoto (2002). "Expression of GATA-2 in human pituitary adenomas." *Mod Pathol* **15**(1): 11-17.
- Vankelecom, H. (2007). "Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell." *Semin Cell Dev Biol* **18**(4): 559-570.
- Viger, R. S., S. M. Guittot, M. Anttonen, D. B. Wilson and M. Heikinheimo (2008). "Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease." *Mol Endocrinol* **22**(4): 781-798.
- Wang, F., Y. Zhu, L. Guo, L. Dong, H. Liu, H. Yin, Z. Zhang, Y. Li, C. Liu, Y. Ma, W. Song, A. He, Q. Wang, L. Wang, J. Zhang, J. Li and J. Yu (2014). "A regulatory circuit comprising GATA1/2 switch and microRNA-27a/24 promotes erythropoiesis." *Nucleic Acids Res* **42**(1): 442-457.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

- Wegner, M. (1999). "From head to toes: the multiple facets of Sox proteins." *Nucleic Acids Res* **27**(6): 1409-1420.
- Westerfield, M. (1995). "The Zebrafish Book; Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio Rerio*), third ed. University of Oregon Press, Eugene, Oregon."
- Whittington, C. M. and A. B. Wilson (2013). "The role of prolactin in fish reproduction." *Gen Comp Endocrinol* **191**: 123-136.
- Whyatt, D. J., E. deBoer and F. Grosveld (1993). "The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities." *EMBO J* **12**(13): 4993-5005.
- Wienholds, E., F. van Eeden, M. Kusters, J. Mudde, R. H. Plasterk and E. Cuppen (2003). "Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish." *Genome Res* **13**(12): 2700-2707.
- Williamson, K. A., A. M. Hever, J. Rainger, R. C. Rogers, A. Magee, Z. Fiedler, W. T. Keng, F. H. Sharkey, N. McGill, C. J. Hill, A. Schneider, M. Messina, P. D. Turnpenny, J. A. Fantès, V. van Heyningen and D. R. FitzPatrick (2006). "Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome." *Hum Mol Genet* **15**(9): 1413-1422.
- Wilson, M. and P. Koopman (2002). "Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators." *Curr Opin Genet Dev* **12**(4): 441-446.
- Wilson, M. E., K. Y. Yang, A. Kalousova, J. Lau, Y. Kosaka, F. C. Lynn, J. Wang, C. Mrejen, V. Episkopou, H. C. Clevers and M. S. German (2005). "The HMG box transcription factor Sox4 contributes to the development of the endocrine pancreas." *Diabetes* **54**(12): 3402-3409.
- Wiser, A., F. Shehata, H. Holzer, J. H. Hyman, E. Shalom-Paz, W. Y. Son and T. Tulandi (2013). "Effect of high LH/FSH ratio on women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro maturation treatment." *J Reprod Med* **58**(5-6): 219-223.
- Wong, T. T., Y. Gothilf, N. Zmora, K. E. Kight, I. Meiri, A. Elizur and Y. Zohar (2004). "Developmental expression of three forms of gonadotropin-releasing hormone and ontogeny of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in gilthead seabream (*Sparus aurata*)." *Biol Reprod* **71**(3): 1026-1035.
- Wood, H. B. and V. Episkopou (1999). "Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages." *Mech Dev* **86**(1-2): 197-201.
- Woods, K. S., M. Cundall, J. Turton, K. Rizotti, A. Mehta, R. Palmer, J. Wong, W. K. Chong, M. Al-Zyoud, M. El-Ali, T. Otonkoski, J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, I. C. Robinson, R. Lovell-Badge, K. J. Woodward and M. T. Dattani (2005). "Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism." *Am J Hum Genet* **76**(5): 833-849.
- Woods, K. S., M. Cundall, J. Turton, K. Rizotti, A. Mehta, R. Palmer, J. Wong, W. K. Chong, M. Al-Zyoud, M. El-Ali, T. Otonkoski, J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, I. C. Robinson, R. Lovell-Badge, K. J. Woodward and M. T. Dattani (2005). "Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism." *Am J Hum Genet* **76**(5): 833-849.
- Wurm, A., E. Sock, R. Fuchshofer, M. Wegner and E. R. Tamm (2008). "Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11." *Exp Eye Res* **86**(6): 895-907.
- Ya, J., M. W. Schilham, P. A. de Boer, A. F. Moorman, H. Clevers and W. H. Lamers (1998). "Sox4-deficiency syndrome in mice is an animal model for common trunk." *Circ Res* **83**(10): 986-994.
- Yang, Z., H. Jiang, F. Zhao, D. B. Shankar, K. M. Sakamoto, M. Q. Zhang and S. Lin (2007). "A highly conserved regulatory element controls hematopoietic expression of GATA-2 in zebrafish." *BMC Dev Biol* **7**: 97.
- Zhadanov, A. B., N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and H. Westphal (1995). "Genomic structure and chromosomal localization of the mouse LIM/homeobox gene Lhx3." *Genomics* **27**(1): 27-32.
- Zhang, F. P., M. Markkula, J. Toppari and I. Huhtaniemi (1995). "Novel expression of luteinizing hormone subunit genes in the rat testis." *Endocrinology* **136**(7): 2904-2912.
- Zhang, J., Q. Liang, Y. Lei, M. Yao, L. Li, X. Gao, J. Feng, Y. Zhang, H. Gao, D. X. Liu, J. Lu and B. Huang (2012). "SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression." *Cancer Res* **72**(17): 4597-4608.
- Zhou, Y., K. C. Lim, K. Onodera, S. Takahashi, J. Ohta, N. Minegishi, F. Y. Tsai, S. H. Orkin, M. Yamamoto and J. D. Engel (1998). "Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development." *EMBO J* **17**(22): 6689-6700.

- Zhu, X., A. S. Gleiberman and M. G. Rosenfeld (2007). "Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks." *Physiol Rev* **87**(3): 933-963.
- Zhu, X., C. R. Lin, G. G. Prefontaine, J. Tollkuhn and M. G. Rosenfeld (2005). "Genetic control of pituitary development and hypopituitarism." *Curr Opin Genet Dev* **15**(3): 332-340.
- Zhu, X., J. Zhang, J. Tollkuhn, R. Ohsawa, E. H. Bresnick, F. Guillemot, R. Kageyama and M. G. Rosenfeld (2006). "Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis." *Genes Dev* **20**(19): 2739-2753.
- Zhu, Y., J. W. Stiller, M. P. Shaner, A. Baldini, J. L. Scemama and A. A. Capehart (2004). "Cloning of somatolactin alpha and beta cDNAs in zebrafish and phylogenetic analysis of two distinct somatolactin subtypes in fish." *J Endocrinol* **182**(3): 509-518.
- Zhu, Y., J. W. Stiller, M. P. Shaner, A. Baldini, J. L. Scemama and A. A. Capehart (2004). "Cloning of somatolactin alpha and beta cDNAs in zebrafish and phylogenetic analysis of two distinct somatolactin subtypes in fish." *J. Endocrinol* **182**(3): 509-518.
- Zilinski, C. A., R. Shah, M. E. Lane and M. Jamrich (2005). "Modulation of zebrafish pitx3 expression in the primordia of the pituitary, lens, olfactory epithelium and cranial ganglia by hedgehog and nodal signaling." *Genesis* **41**(1): 33-40.

Annexes