

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur  
de l'université Louis Pasteur Strasbourg I  
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par **Sylvia Lehmann**

*Etude de DAX-1 et de sa perte de fonction  
dans l'hypoplasie congénitale des glandes  
surrénales*

Soutenue publiquement le 15 avril 2005

**MEMBRES DU JURY**

Directeur de thèse : **Dr Paolo Sassone-Corsi**, Directeur de recherche,  
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch

Rapporteur interne : **Dr Cécile Rochette-Egly**, Directeur de recherche,  
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch

Rapporteur externe : **Dr Martine Bégeot**, Directeur de recherche,  
Faculté de Médecine Laennec, Lyon

Rapporteur externe : **Pr Georges Veyssière**, Professeur,  
Université Blaise Pascal Clermont II, Aubière

Examinateur : **Pr Jean-Louis Mandel**, Professeur,  
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch

Examinateur encadrant de la thèse : **Dr Enzo Lalli**, Directeur de recherche,  
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.*

*Je remercie mon directeur de thèse Paolo, de m'avoir acceptée dans son équipe et de la confiance qu'il m'a portée. Je remercie aussi Enzo, qui m'a encadrée pendant ma thèse.*

*Je remercie tous les membres passés et actuels du labo PSC et des labos voisins. Parmi les anciens je remercie tout particulièrement : Aurore la parigotte, vive les soirées Mont d'Or, Stefanuccio, merci pour ta sympathie et ton aide, tu as été comme un grand frère pour moi, Claudia, merci pour ton aide et ta gentillesse, la Poulette, les deux Nico le Québécois et l'Alsacien, et aussi ... je n'arrive pas à t'imaginer dans les anciens et à me faire à l'idée de ton départ, Estelle, merci beaucoup pour ton aide, ton soutien et ton écoute... et parmi ceux qui sont toujours là, Irène merci pour tout, Ullas thanks for all advices and animated lunch time discussions, Jun, Noora, Céline, Nadine et tous ceux qui m'ont aidée et ont égayé mes journées...*

*Un p'tit coucou à mes collègues de la bibliothèque qui sont encore en train d'écrire, courage, et merci aux nouveaux docteurs de m'avoir fait partager leur expérience.*

*Je remercie tous les services communs de l'institut, notamment ceux de culture de cellules, de synthèse d'oligos, de séquençage, les dames de la bibliothèque, toute l'équipe de microscopie avec Didier et Marcel, et Manuela pour son aide pour la 2D. Je remercie tous les membres de l'équipe de Nicole Gallo-Payet ainsi que Nicole, pour m'avoir accueillie parmi eux lors d'une collaboration, et avec qui ce fut un plaisir de travailler.*

*Je remercie mes amis de toujours, qui ont toujours été là... le club Zozio, avec bien sûr Zozio, Nelly, Juju, Anne-Laure, ainsi que Laurent, Jérôme et les petits dont Lydie, la petite « rescapée », ton sourire est porteur d'espoir et m'a rappelé l'importance de la recherche... Merci à Nadette, tu as aussi atterri ici et tu es toujours là et prête à écouter... Merci à Bernadette pour vos encouragements et pour m'avoir poussée à continuer...*

*Finalement, un grand merci à ceux sans lesquels je ne serais pas là, Gege, Gégé, Pollux, Patoche et Mèmère...*



Abréviations	7
Introduction	10
1. La glande surrénale	10
1.1. Structure et fonction de la glande surrénale	10
1.2. Développement embryonnaire et post-natal de la glande surrénale	12
1.3. La stéroïdogénèse	13
1.4. Régulation de la synthèse d'hormones surrénaliennes	17
2. La superfamille des récepteurs nucléaires	18
2.1. Généralités	18
2.2. Structure des récepteurs nucléaires	20
2.2.1. Organisation modulaire des récepteurs nucléaires	21
2.2.2. Le repliement canonique en sandwich du LBD	22
2.2.3. Mécanisme d'activation dit de « la souricière »	24
2.3. Mécanisme d'action et sa régulation	24
2.3.1. Mécanisme général	24
2.3.2. Recrutement des coactivateurs et activation de la transcription	25
2.3.3. Recrutement des corépresseurs et répression de la transcription	27
2.3.4. Modifications des récepteurs nucléaires et régulation de leur mécanisme d'action	29
2.4. Localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires	30
2.4.1. Le transport nucléocytoplasmique des protéines en général	30
2.4.2. La localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires	31
2.5. SF-1 ou l'exemple d'un « ancien orphelin »	33
2.5.1. Généralités et structure	33
2.5.2. Sites d'expression, modèle animal et mutations chez l'Homme	34
2.5.3. Fonction d'activateur transcriptionnel réprimée par DAX-1	35
3. DAX-1	36
3.1. Le gène <i>DAX-1</i> , l'AHC-HHG	36

3.2. Les mutations du gène <i>DAX-1</i> identifiées chez les patients avec AHC-HHG	39
3.3. Les homologues identifiés chez d'autres espèces	41
3.4. Les sites d'expression de DAX-1	41
3.4.1. Au cours du développement et à l'âge adulte chez l'Homme	41
3.4.2. Au cours du développement chez la souris	42
3.4.3. A l'âge adulte chez la souris	43
3.5. Les modèles animaux	44
3.6. Rôle de DAX-1 dans la détermination du sexe	45
3.7. La protéine DAX-1, modèle d'homologie structurale et isoformes	47
3.8. Régulation de l'expression de DAX-1	51
3.9. DAX-1, répresseur transcriptionnel et rôle post-transcriptionnel	51
3.9.1. Activité de répression intrinsèque de DAX-1 et liaison à l'ADN	51
3.9.2. Répression globale de la stéroïdogénèse	52
3.9.3. Répression de la transactivation effectuée par SF-1 et d'autres facteurs	52
3.9.4. Répression de la transactivation effectuée par divers récepteurs nucléaires	53
3.9.5. Recrutement de corépresseurs par DAX-1	55
3.9.6. Rôle post-transcriptionnel de DAX-1	56
<b>But du travail</b>	<b>57</b>
<b>Résultats</b>	<b>58</b>
<b>Publication n°1</b>	<b>58</b>
<b>Publication n°2</b>	<b>64</b>
<b>Publication n°3</b>	<b>74</b>
<b>Résultats complémentaires</b>	<b>93</b>

Discussion et perspectives	96
Bibliographie	103
Annexes	120

## Abréviations

3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
ACTH	adrenocorticotropic hormone
AF	activation function
AHC	adrenal hypoplasia congenita
Ang II	angiotensin II
AR	androgen receptor
C-ter	carboxy-terminal
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
COUP-TF	chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor
CRH	corticotropin releasing hormone
DAX-1	DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1
DBD	DNA binding domain
DHEA	déhydroépiandrostérone
DHR38	drosophila hormone receptor 38
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DSS	dosage-sensitive sex reversal
EcR	ecdysteroid receptor
ER	estrogen receptor
FSH	follicle stimulating hormone
GH	growth hormone
GKD	glycerol kinase deficiency
GR	glucocorticoid receptor
HAT	histone acetyl transferase

HDAC	histone deacetylase
HHG	hypogonadotropic hypogonadism
HMT	histone methyl transferase
LBD	ligand binding domain
LH	luteinizing hormone
LRH-1	liver receptor homolog-1
NCoR	nuclear receptor corepressor
MIS	müllerian inhibiting substance
MR	mineralocorticoid receptor
N-ter	amino-terminal
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
Nurr1	nur-related factor 1
P450aldo	cytochrome P450 aldostérone synthase
P450arom	cytochrome P450 aromatase
P450c11	cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase
P450c17	cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20 lyase
P450scc	cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PR	progesterone receptor
RAR	retinoid acid receptor
ROR	retinoic acid receptor related orphan receptor
RXR	retinoid X receptor
SF-1	steroidogenic factor-1
SHP	small heterodimer partner

SMRT	silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors
Sox9	SRY related HMG box 9
SRY	sex-determining region Y chromosome
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TR	thyroid hormone receptor
TSH	thyroid-stimulating hormone
VDR	vitamin D receptor
VMH	ventromedial hypothalamic nucleus
WT1	Wilm's tumor-associated gene 1

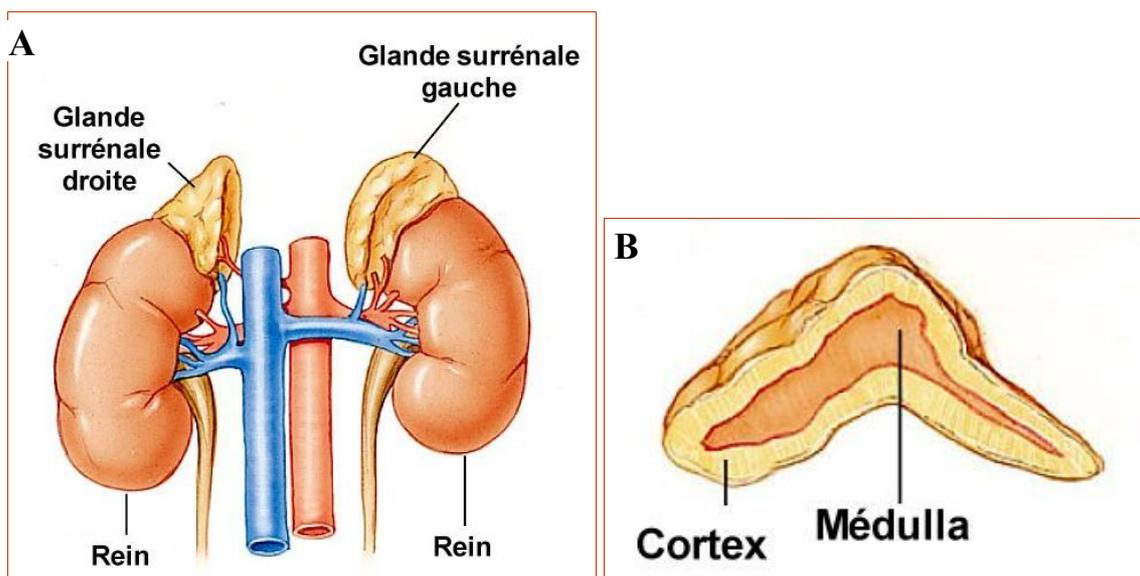


# Introduction

# 1. La glande surrénale

## 1.1. Structure et fonction de la glande surrénale

Les surrénales sont des glandes endocrines encapsulées qui coiffent le pôle supérieur des reins (Figure 1A). Une surrénale adulte humaine pèse de 4 à 6g. Les surrénales sont constituées de deux zones tissulaires, la médullo-surrénale et la cortico-surrénale, qui ont une origine différente sur le plan embryologique et qui ont des fonctions différentes (Figure 1B).



**Figure 1** : Localisation des glandes surrénales par rapport aux reins (A) et coupe transversale d'une glande surrénale indiquant le cortex et la médulla (B).

La médullo-surrénale est située au centre de la glande et assure la synthèse des catécholamines (adrénaline, noradrénaline).

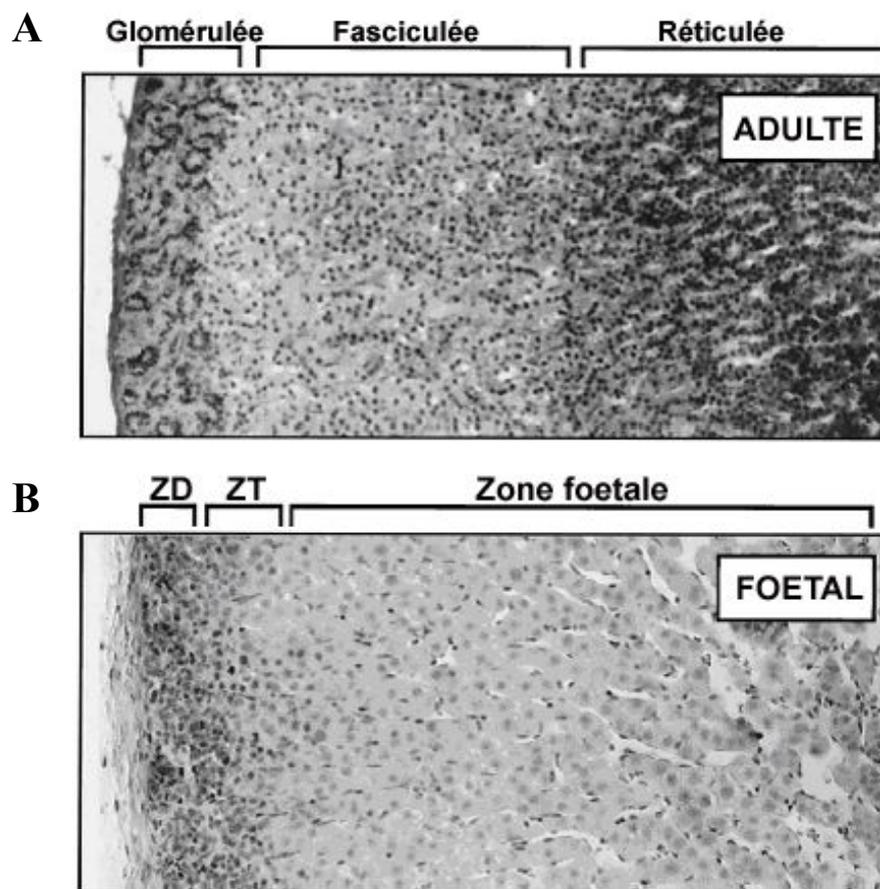
La cortico-surrénale est située en périphérie de la glande et assure la synthèse de stéroïdes dérivant du cholestérol. Chez les mammifères, la cortico-surrénale adulte est divisée en trois zones concentriques distinctes d'un point de vue morphologique et fonctionnel (Figure 2A) :

➤ La zone glomérulée est une fine couche située immédiatement sous la capsule qui sécrète des minéralocorticoïdes (aldostérone) qui régulent l'homéostasie hydrominérale. L'aldostérone intervient dans la régulation du métabolisme du sodium et du potassium. L'aldostérone agit au niveau des reins, de la muqueuse intestinale et des

glandes salivaires et sudoripares en favorisant la rétention d'eau, de sodium et l'élimination de potassium afin de contrôler la volémie.

➤ La zone fasciculée est la plus large des trois zones de la cortico-surrénale. Elle sécrète surtout des glucocorticoïdes : le cortisol (présent seulement chez l'Homme et le bœuf). Chez d'autres espèces (où une enzyme particulière la P450C17 est absente) le cortisol est remplacé par la corticostérone. Les glucocorticoïdes ont un rôle important dans la réponse au stress notamment en agissant sur la glycémie. Ils agissent sur le métabolisme glucidique, protéique et lipidique et ont un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire.

➤ La zone réticulée est la zone la plus interne et elle sécrète en faible quantité des glucocorticoïdes et des stéroïdes androgènes : la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfate (DHEA-S) (Mesiano and Jaffe, 1997).



**Figure 2** : Structure du cortex de la glande surrénale adulte (A) et fœtale (B) d'après (Mesiano and Jaffe, 1997). La surrénale adulte est formée de trois zones : glomérulée, fasciculée et réticulée. La surrénale fœtale est composée de la zone définitive (ZD), la zone transitoire (ZT), et la zone fœtale (ZF).

## **1.2. Développement embryonnaire et post-natal de la glande surrénale**

Le cortex et la médulla ont une origine différente sur le plan embryologique. La corticosurrénale est d'origine mésodermique et dérive de l'épithélium cœlomique, alors que la médulla est d'origine neuro-ectodermique.

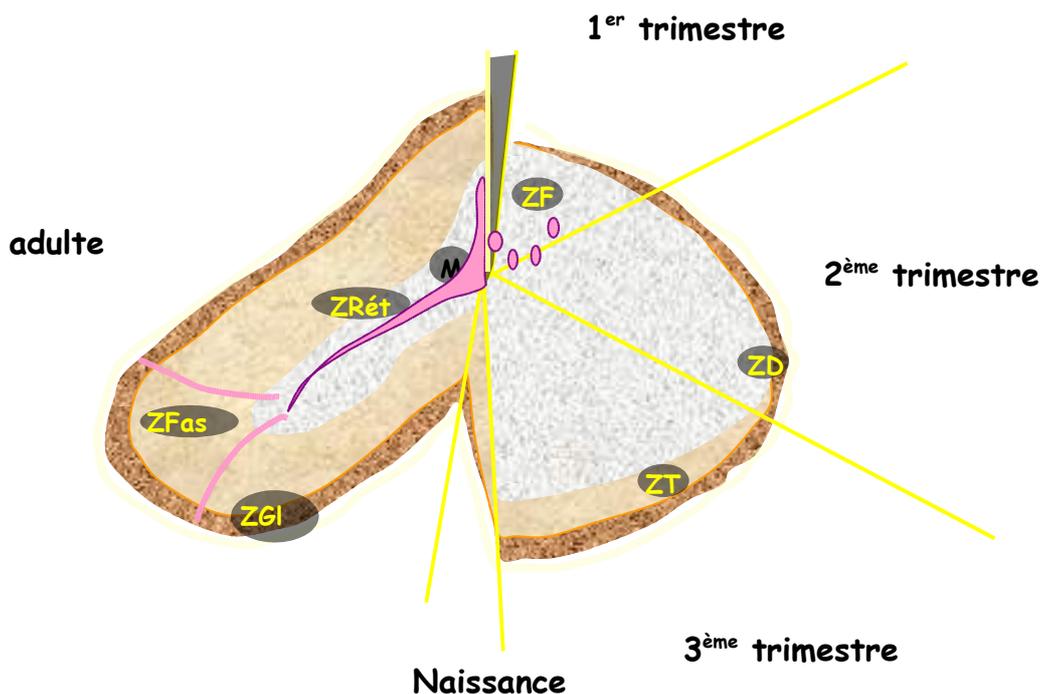
Le cortex primitif ou fœtal apparaît tôt au cours de l'embryogenèse. En effet chez l'Homme, dès 3 à 4 semaines de grossesse, on observe une condensation de l'épithélium cœlomique qui va migrer et proliférer pour former la crête uro-génitale qui est à l'origine des gonades, des reins et des surrénales. Puis la crête uro-génitale va se scinder en deux : le primordium adrénogénital (qui va aboutir à la formation des surrénales et des gonades) et l'ébauche des reins. Ensuite, l'ébauche de la surrénale fœtale va se séparer, et à 8 semaines on peut différencier les deux zones du cortex surrénalien, la zone fœtale (ZF) à l'intérieur, et la zone définitive (ZD) ou permanente à l'extérieur, qui vont être encapsulées par des cellules mésenchymateuses à la 9<sup>ème</sup> semaine (pour une représentation de la formation de la glande surrénale voir la figure 3). Le cortex fœtal va ensuite être colonisé par des cellules de la crête neurale qui vont se regrouper en îlots de cellules chromaffines qui vont dans les premières semaines après la naissance se regrouper au centre de la surrénale pour former la médulla qui aura une apparence identique à la médulla adulte 12 à 18 mois après la naissance.

Au second trimestre de grossesse, la zone fœtale est très développée (elle représente 80% de la glande) et elle est composée de larges cellules. La zone définitive est une étroite bande de cellules dans la région sous capsulaire. Puis, on voit apparaître une zone de transition (ZT) entre la ZD et la ZF qui est constituée de cellules qui ont des caractéristiques intermédiaires (Figure 2B).

Le cortex surrénalien fœtal est un organe dynamique au sein duquel on observe une activité mitotique limitée à la zone externe, une migration centripète couplée d'une différenciation des cellules, et une apoptose cellulaire dans le compartiment le plus interne. Les différents composants de la matrice extracellulaire du cortex surrénalien fœtal influencent la sécrétion de stéroïdes et le devenir des cellules (prolifération ou mort cellulaire) (Chamoux et al., 2002). Rapidement après la naissance, le cortex surrénalien subit un remodelage drastique caractérisé par une diminution du nombre et du volume des cellules, et notamment par la régression de la ZF par apoptose des cellules. En effet à 4 jours post-natals la glande a perdu 1/4 de sa masse et après 1 mois elle a diminué de moitié. Puis les cellules de la ZD et ZT vont se différencier et migrer pour former les trois zones caractéristiques de la surrénale adulte. Ce processus est long car la surrénale atteint sa structure finale vers 10 à 20 ans chez

l'Homme (Keegan and Hammer, 2002). Le développement correct de la glande surrénale fœtale est essentiel pour la maturation fœtale de différents organes (poumons, foie..) qui est achevée grâce à la synthèse de cortisol par la surrénale fœtale. En effet au cours de la grossesse la surrénale secrète du cortisol (tôt dans la grossesse), du DHEA à partir de 8-10 semaines et des minéralocorticoïdes faiblement au début, puis en quantité plus importante au troisième trimestre. Plusieurs facteurs agissant au niveau moléculaire et essentiels pour la formation et la fonction des glandes surrénales ont été identifiés, les deux mieux caractérisés étant DAX-1 (DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1) et SF-1 (steroidogenic factor 1).

Le développement des surrénales comme décrit précédemment est observé chez les primates, cependant chez les autres espèces il est différent. Chez les rongeurs, la formation des différentes zones est achevée à la naissance, et après la naissance on observe une zone X (considérée comme analogue à la ZF) qui régresse chez le mâle à la maturation sexuelle et chez la femelle au cours de la première gestation.



**Figure 3** : Représentation schématique de la structure de la glande surrénale au cours du développement et jusqu'à l'âge adulte chez l'Homme (adaptée d'après Nicole Gallo-Payet). Les îlots de cellules chromaffines ainsi que la médulla sont représentés en rose. ZD : zone définitive ; ZT : zone transitoire ; ZF : zone fœtale ; M : médulla ; ZGlo : zone glomérulée ; ZFas : zone fasciculée ; ZRé : zone réticulée.

### **1.3. La stéroïdogénèse**

La stéroïdogénèse est le processus par lequel des cellules spécialisées dans des tissus spécifiques synthétisent les hormones stéroïdiennes, une classe importante d'hormones lipidiques possédant un noyau stérol (Parker and Schimmer, 1997; Stocco, 2001). Les différentes hormones stéroïdiennes sont synthétisées dans différents tissus qui sont : les surrénales où sont synthétisés le cortisol ou la corticostérone, l'aldostérone et les DHEA et DHEA-S ; les ovaires et le placenta où sont synthétisés les progestogènes et les oestrogènes ; les testicules où sont synthétisés les androgènes ; et le cerveau qui est le lieu de synthèse de neurostéroïdes. Le précurseur commun pour la biosynthèse de toutes les hormones stéroïdiennes est le cholestérol. La principale source de cholestérol est exogène et est fournie par l'alimentation ou le foie et une plus faible proportion de cholestérol provient de la synthèse *de novo* par les cellules cortico-surrénales.

La première étape de la formation des hormones stéroïdiennes est le transfert du cholestérol hydrophobe de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie en traversant l'espace hydrophile intra mitochondrial. Cette étape est limitante et deux protéines importantes pour le transfert du cholestérol ont été identifiées : StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) et le récepteur PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor).

Du cholestérol aux hormones actives, la biosynthèse procède par l'intermédiaire de nombreuses activités enzymatiques (Figure 4). Certaines enzymes qui catalysent des réactions terminales ont un profil d'expression variant suivant les divers sites stéroïdogènes, ce qui aboutit à la synthèse des différentes hormones dans les différentes zones ou tissus. La deuxième étape de la stéroïdogénèse est commune à tous les tissus et est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par l'enzyme mitochondriale P450<sub>sc</sub> (cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage ou CYP11A1) qui est présente dans tous les tissus stéroïdogènes et qui aboutit à la formation de la prégnénolone et d'un dérivé toxique qui sera éliminé. La prégnénolone quitte ensuite la mitochondrie et est transférée vers la membrane du réticulum endoplasmique où elle est convertie en progestérone par l'enzyme 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase). Les étapes suivantes varient suivant les différentes zones du cortex surrénalien et les différents tissus stéroïdogènes.

Dans les zones fasciculée et réticulée, le cortisol et la corticostérone sont produits grâce à l'action des enzymes P450<sub>c21</sub> (cytochrome P450 21-hydroxylase ou CYP21A1) et P450<sub>c11</sub> (cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase ou CYP11B1), cette dernière étant spécifiquement exprimée dans ces deux zones. La P450<sub>c17</sub> (cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20 lyase)

qui est nécessaire pour la formation de cortisol (et non de corticostérone) est présente chez l'Homme mais est absente chez les primates qui sécrètent seulement de la corticostérone. De plus, la P450c17 possède deux activités enzymatiques : l'activité 17 $\alpha$ -hydroxylase qui transforme la prégénolone et la progestérone et qui en agissant seule va favoriser la voie des glucocorticoïdes, et la seconde activité : 17, 20 lyase qui va transformer les dérivés hydroxylés de la prégénolone et de la progestérone. Lorsque les deux activités fonctionnent, elles vont favoriser la voie des androgènes. Les androgènes surrénaliens produits sont la DHEA et son dérivé sulfate DHAE-S, et leur synthèse requiert les deux activités de la P450c17.

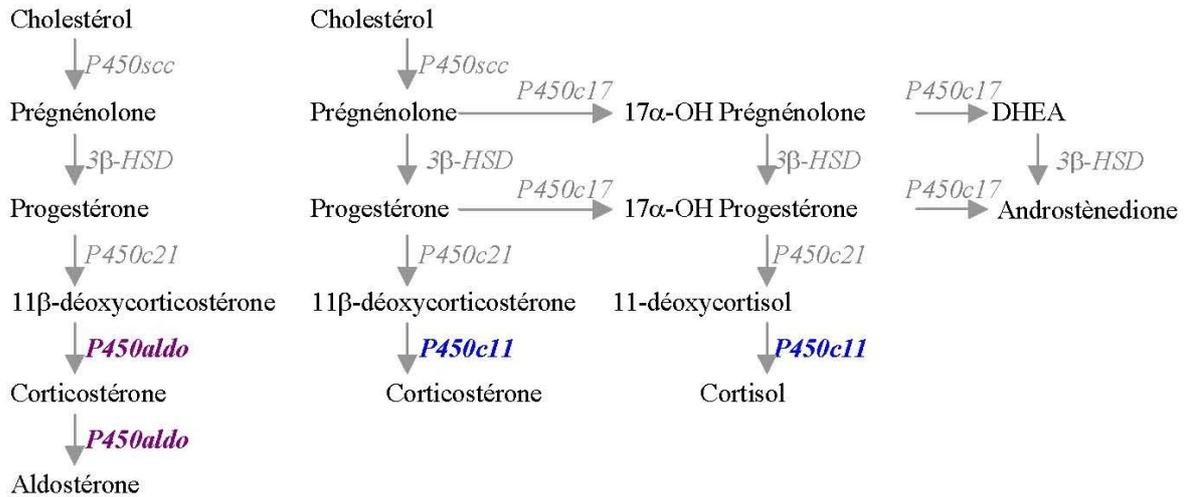
Dans la zone glomérulée, la synthèse d'aldostérone requiert les enzymes P450c21 (ou CYP21) et P450aldo (cytochrome P450 aldosterone synthase ou CYP11B2). La P450aldo est exprimée seulement dans cette zone et catalyse la transformation de corticostérone en aldostérone.

Dans les gonades, la production de testostérone requiert l'enzyme 17 $\beta$ -HSD (17  $\beta$ -HydroxySteroid Dehydrogenase), et celle des oestrogènes nécessite l'action de la P450arom (cytochrome P450 aromatasase). Cette production se fait à partir du cholestérol ou des androgènes synthétisés par la surrénale et présents dans le sang.

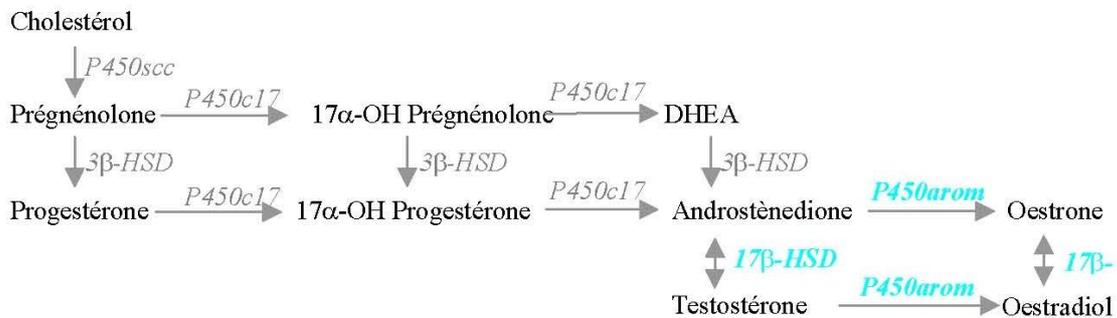
## A. Cortex surrénalien

### Glomérulée

### Fasciculée et réticulée



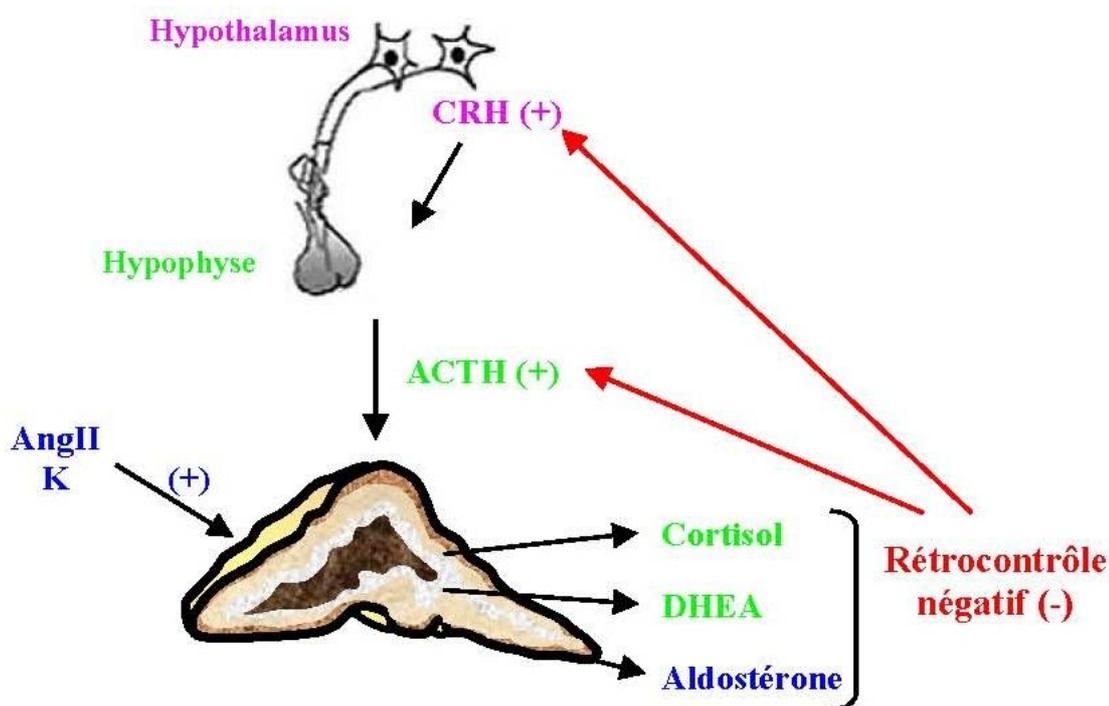
## B. Gonades



**Figure 4 : Biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans le cortex surrénalien (A) et les gonades (B)** (Parker and Schimmer, 1997). Les enzymes exprimées seulement dans une zone ou un organe précis et dictant la spécificité de production d'hormones dans cette zone sont indiquées de la même couleur que la zone correspondante. Abréviations : P450scc (cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage) ; 3β-HSD (3β-hydroxystéroïde déshydrogénase) ; P450c21 (cytochrome P450 21-hydroxylase) ; P450c11 (cytochrome P450 11β-hydroxylase) ; P450c17 (cytochrome P450 17α-hydroxylase/17, 20 lyase) ; P450aldo (cytochrome P450 aldostérone synthase) ; P450arom (cytochrome P450 aromatasé).

### 1.4. Régulation de la synthèse d'hormones surrénaliennes

Les sécrétions de la cortico-surrénale sont très régulées. La sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée est contrôlée par un grand nombre de facteurs, les plus importants stimuli étant l'hormone corticotrope ACTH (Adrenocorticotropic Hormone), l'angiotensine II (Ang II) et une élévation de la concentration plasmatique en potassium. Quant aux sécrétions des zones fasciculée et réticulée, elles sont contrôlées par l'ACTH. La fonction cortico-surrénalienne est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 5). L'hypothalamus intègre des stimuli nerveux et synthétise la CRH (Corticotropin Releasing Hormone) qui va stimuler la synthèse de l'ACTH par l'antéhypophyse. Puis l'ACTH va agir au niveau de la cortico-surrénale en stimulant principalement la sécrétion des glucocorticoïdes et à moindre mesure des minéralocorticoïdes qui vont ensuite exercer un rétrocontrôle négatif en inhibant la synthèse d'ACTH. L'ACTH a des effets à court terme (sur la stéroïdogénèse) et à long terme (trophique) sur la surrénale.



**Figure 5 :** Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien. La CRH (Corticotropin Releasing Hormone) libérée par l'hypothalamus va induire la libération d'ACTH (Adrenocorticotropin Hormone) par l'antéhypophyse. L'ACTH va ensuite stimuler, principalement la sécrétion de cortisol, mais aussi à moindre mesure d'aldostérone, qui vont en retour exercer un rétrocontrôle négatif en inhibant la synthèse d'ACTH. L'angiotensine 2 (AngII), ainsi qu'une concentration élevée de potassium (K) sont les principaux déclencheurs de la sécrétion d'aldostérone.

## 2. La superfamille des récepteurs nucléaires

### 2.1. Généralités

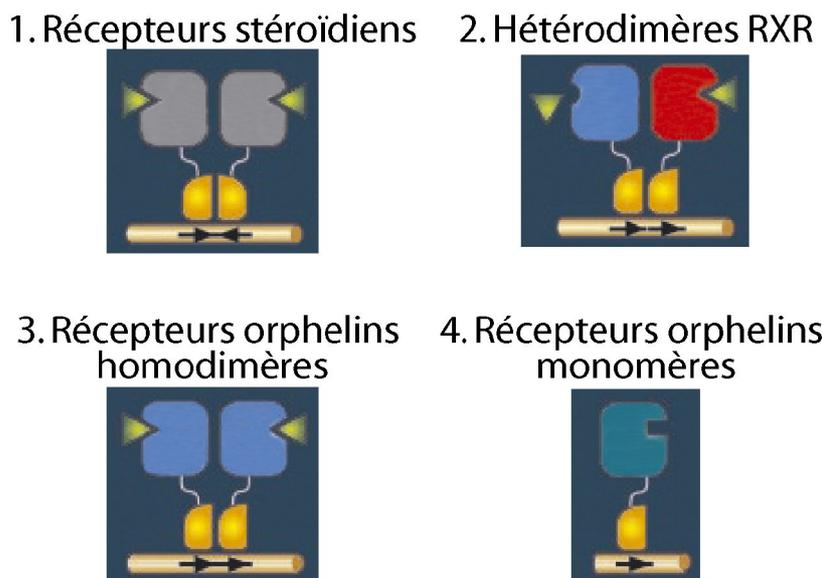
Les cellules de l'organisme doivent en permanence être renseignées sur leur environnement afin d'adapter leur fonctionnement en réponse à celui-ci. La transmission de l'information met en jeu deux grands types de voies de transduction du signal qui utilisent des facteurs de transcription pour réguler des programmes génétiques spécifiques. La première voie concerne les facteurs de croissance, les hormones peptidiques, les neurotransmetteurs qui sont des signaux extracellulaires qui activent des récepteurs ancrés dans la membrane plasmique appelés « récepteurs membranaires ». Cette activation va induire des cascades intracellulaires qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription qui vont réguler l'expression de gènes cibles. La seconde voie de transduction du signal concerne des petites molécules hydrophobes, vitamines et hormones liposolubles, intermédiaires métaboliques, qui pénètrent ou sont libérés au sein de la cellule cible et vont se fixer et activer des récepteurs appelés « récepteurs nucléaires » qui vont réguler directement l'expression de gènes cibles. Ces deux types de transduction du signal sont interdépendants, les récepteurs nucléaires étant capables d'intégrer des signaux provenant des récepteurs membranaires, et aussi d'intervenir dans les cascades d'évènements survenant en aval de l'activation des récepteurs membranaires.

Les récepteurs nucléaires représentent une des plus larges familles de facteurs de transcription, comprenant 49 membres identifiés dans le génome humain, 21 dans celui de *Drosophila melanogaster* et plus de 270 chez *Caenorhabditis elegans* (Robinson-Rechavi et al., 2001). Ils jouent un rôle crucial dans l'homéostasie, la reproduction, le développement et le métabolisme en contrôlant la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose cellulaire. Ils ont la capacité de se lier à l'ADN et de réguler l'expression de gènes cibles dans des tissus spécifiques (pour une revue sur les récepteurs nucléaires voir (Aranda and Pascual, 2001). L'activité de régulation transcriptionnelle de la plupart des récepteurs nucléaires est contrôlée par la fixation de petites molécules lipophiles, comme les hormones stéroïdiennes (androgènes, estrogènes, progestogènes, minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes), les hormones thyroïdiennes, des vitamines (D, rétinoïdes) ou des intermédiaires métaboliques synthétisés au sein des cellules (acides gras, dérivés du cholestérol...).

Les premiers récepteurs nucléaires qui ont été clonés au milieu des années 80 étaient des récepteurs aux hormones stéroïdiennes tels que le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)

(Hollenberg et al., 1985) et aux estrogènes (ER) (Green et al., 1986). Puis rapidement, d'autres récepteurs activés par des ligands non-stéroïdiens, tels que la vitamine A (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987) ou l'hormone thyroïdienne (Sap et al., 1986; Weinberger et al., 1986) ont été isolés et caractérisés, suggérant que les récepteurs nucléaires régulent l'expression de gènes spécifiques en réponse à une grande variété de ligands lipophiles. Depuis, de nombreux récepteurs nucléaires ont été clonés et identifiés, surtout grâce à leur similarité de séquence avec d'autres récepteurs connus, et pour certains avant l'identification de leur ligand. Ces récepteurs sont donc appelés orphelins car ils n'ont pas de ligand caractérisé. L'identification de leur ligand naturel ou synthétique a permis d'« adopter » certains de ces orphelins, comme c'est le cas récemment pour SF-1 et LRH-1 (liver receptor homolog-1) (Krylova et al., 2005; Li et al., 2005). Cependant, certains récepteurs comme Nurr1 (Nur-related factor 1) (Wang et al., 2003) et DHR38 (Drosophila hormone receptor 38) (Baker et al., 2003), sont de vrais orphelins. En effet, les structures de leur LBD (Ligand Binding Domain) récemment résolues supportent l'hypothèse d'un récepteur ancestral orphelin, la capacité à fixer un ligand étant apparue au cours de l'évolution (Laudet, 1997).

Une première classification des récepteurs nucléaires avait été établie selon la nature du ligand et le mode de fixation à l'ADN (voir figure 6 et (Mangelsdorf et al., 1995; Olefsky, 2001)). La première classe inclut les récepteurs aux hormones stéroïdiennes qui se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères. Les membres de cette classe sont AR (androgen receptor), GR (glucocorticoid receptor), ER (estrogen receptor), MR (mineralocorticoid receptor) et PR (progesterone receptor). La deuxième classe comprend les récepteurs qui hétérodimérisent avec RXR (retinoid X receptor) et notamment TR (thyroid hormone receptor), RAR (retinoid acid receptor), VDR (vitamin D receptor), PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), EcR (ecdysteroid receptor)... La troisième classe regroupe les récepteurs orphelins ainsi que quelques récepteurs possédant des ligands non-stéroïdiens, qui fonctionnent comme homodimères tels que RXR et COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor), et la quatrième, les récepteurs orphelins monomériques tels que SF-1 et ROR (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor).



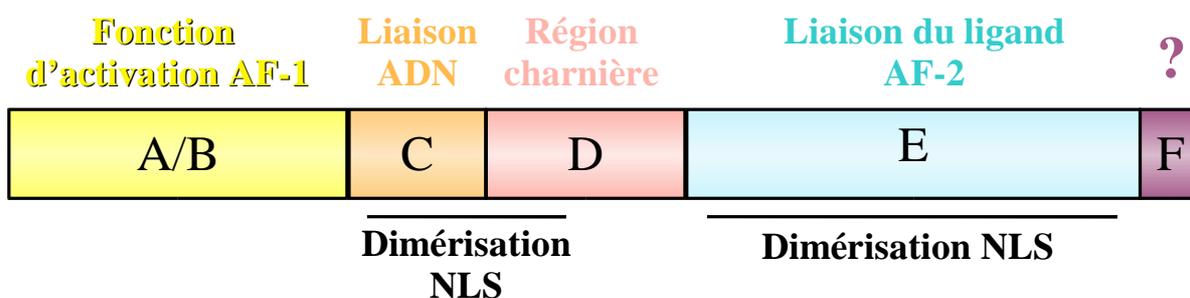
**Figure 6** : Classification des récepteurs nucléaires selon la nature du ligand et le mode de fixation à l'ADN d'après (Olefsky, 2001). Les quatre classes de récepteurs nucléaires, récepteurs aux hormones stéroïdiennes, récepteurs formant des hétérodimères, homodimères ou monomères sont représentées.

Cependant, le nombre croissant de récepteurs a compliqué cette classification et a abouti à l'édification d'une nouvelle classification. Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires ont été classés en 6 sous-familles et 26 groupes qui sont représentés dans l'annexe 1 (Committee, 1999). Cette classification a été établie sur l'évolution de deux domaines conservés chez les récepteurs nucléaires, le domaine de liaison à l'ADN (DBD ou DNA Binding Domain) et le domaine de liaison du ligand (LBD ou Ligand Binding Domain) (Voir chapitre suivant 2.2.). Les récepteurs avec une structure insolite ne contenant qu'un seul de ces deux domaines sont regroupés sans égard à leur origine et évolution dans une sous-famille séparée appelée sous-famille 0, qui est divisée en deux groupes : A pour les récepteurs qui ne possèdent que le DBD et B pour ceux qui n'ont conservés que le LBD.

## **2.2. Structure des récepteurs nucléaires**

### **2.2.1. Organisation modulaire des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires partagent une organisation modulaire en quatre à cinq domaines possédant chacun une ou plusieurs fonctions spécifiques (Figure 7). Ces domaines sont de l'extrémité amino à carboxy-terminale : A/B, C, D, E et F, ce dernier n'étant présent que chez certains récepteurs (Figure 11). Ces domaines sont différentiellement conservés au cours de l'évolution. Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C ou DBD) et au ligand (domaine E ou LBD) sont les plus conservés (Gronemeyer and Laudet, 1995).



**Figure 7 : Structure modulaire des récepteurs nucléaires.** Les différents domaines, A/B, C, D, E et F sont représentés (de la partie N-terminale à la C-terminale). Les fonctions principales des différents domaines sont indiquées : fonction d'activation-1 ou AF-1 pour le domaine A/B ; liaison à l'ADN pour le C ; rôle de charnière pour le D et liaison du ligand et fonction d'activation-2 ou AF-2 pour le E. De plus, les NLS (nuclear localization signals) et les interfaces de dimérisation sont indiqués.

Le domaine A/B amino-terminal est le moins conservé entre les différents membres. Sa taille ainsi que sa séquence primaire sont très variables. Ce domaine possède généralement une fonction d'activation de la transcription AF-1 (Activation Function-1) dite « autonome » ou indépendante du ligand (Bocquel et al., 1989; Simental et al., 1991; Tora et al., 1989). En effet, le domaine A/B fusionné avec un domaine de liaison à l'ADN hétérologue peut activer la transcription de manière constitutive. La présence et la synergie des deux fonctions activatrices AF-1 et 2 (présente dans le domaine E) sont nécessaires pour obtenir l'activation transcriptionnelle complète d'un récepteur nucléaire. Les mécanismes responsables de l'activité constitutive AF-1 sont peu compris. La capacité d'activation de l'AF-1 varie considérablement selon les récepteurs et pour un même récepteur selon les promoteurs et les types cellulaires. Le domaine AF-1 semble être peu structuré et être la cible de nombreuses phosphorylations qui modulent son activité (Warnmark et al., 2003).

Le domaine C ou DBD (DNA Binding Domain) est le plus conservé au sein des récepteurs nucléaires. Il comprend deux structures dites en « doigts de zinc » et est responsable de la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN. Les récepteurs

nucléaires se fixent à l'ADN sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères sur des séquences d'ADN cibles appelées éléments de réponse à l'hormone ou HRE (Hormone Response Element). Le domaine C comporte également une interface de dimérisation.

Le domaine D est très peu conservé au sein de la famille. Il joue un rôle de charnière entre les domaines de liaison à l'ADN et de liaison au ligand qui eux sont très structurés. Cette région se caractérise par une grande flexibilité qui permet d'accommoder les différentes conformations du DBD et du LBD. Ce domaine contient un signal de localisation nucléaire (NLS ou nuclear localization signal).

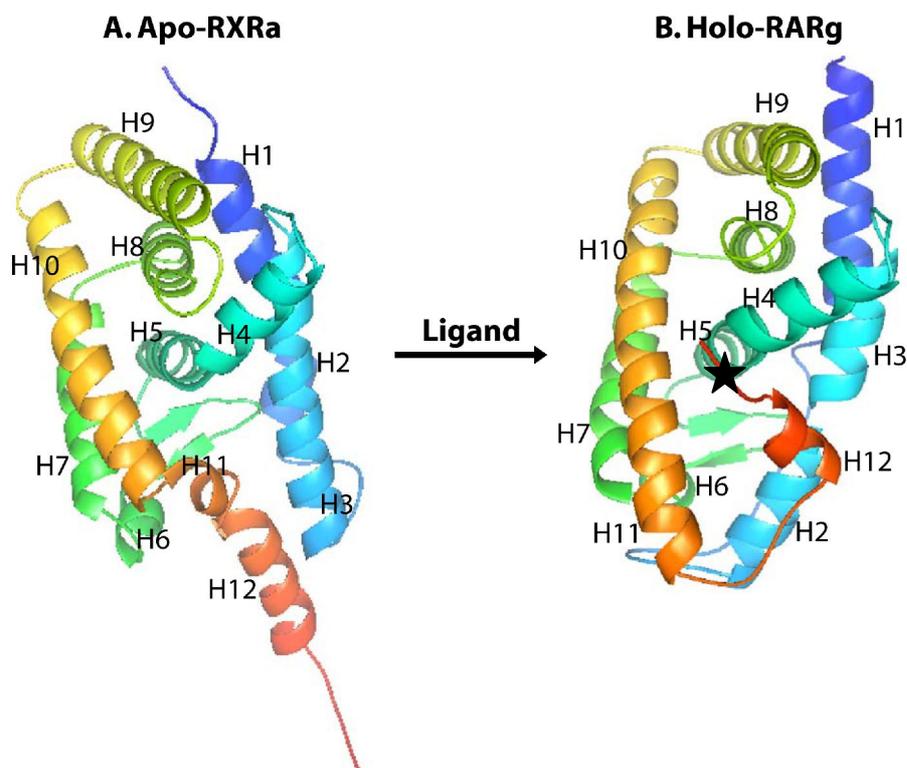
Le domaine E ou LBD (Ligand Binding Domain) présente une bonne conservation. Il est multifonctionnel puisqu'il assure la liaison du ligand, l'interaction avec des protéines de choc thermique, la dimérisation, la localisation nucléaire et la fonction d'activation de la transcription ligand-dépendante nommée AF-2 (Activation Function-2). Le LBD adopte un repliement particulier (Voir paragraphe 2.2.2).

Le domaine F, absent chez certains récepteurs nucléaires, présente un taux de conservation faible et sa fonction est mal connue.

### 2.2.2. Le repliement canonique en sandwich du LBD

La cristallisation des LBDs de plusieurs récepteurs nucléaires a permis de montrer qu'ils partageaient un repliement similaire. Plus particulièrement, le LBD des récepteurs nucléaires adopte un repliement canonique en « sandwich d'hélices  $\alpha$  » composé de trois couches. Cette structure canonique est composée de 12 hélices  $\alpha$  (numérotées de H1 à H12) et d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle (Figure 8A). Une première couche est constituée des hélices H1, H2 et H3. Les hélices H4, H5, H6, H8 et H9 forment la couche centrale et H7, H10 et H11 la dernière couche. Il existe quelques variations autour de cette organisation canonique, avec la présence de courtes hélices supplémentaires, la disparition ou l'amplification du feuillet  $\beta$ , et parfois la disparition de l'hélice H2. L'analyse des séquences et la comparaison des deux premières structures de LBD (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995) ont permis de mettre en évidence un motif « signature » du LBD qui comporte des résidus conservés essentiels pour maintenir ensemble et stabiliser les hélices H3, H4, H5, H8 et H9 ainsi que les boucles 3-4 et 8-9, afin de former le cœur hydrophobe du LBD (Wurtz et al., 1996). Des interactions polaires supplémentaires contribuent à la stabilisation du repliement. Le repliement du LBD crée une

cavité, la poche du ligand (LBP pour Ligand Binding Pocket) où le ligand va se loger (Moras and Gronemeyer, 1998). La taille de la LBP est variable selon les récepteurs, la plus large est celle présente chez PPAR $\gamma$ . La LBP est tapissée principalement par des résidus hydrophobes et par quelques résidus polaires qui servent de points d'ancrage pour le ligand.



**Figure 8** : Structures cristallines de RXR $\alpha$  apo (A) et RAR $\gamma$  holo (B) et mécanisme d'activation de la transcription dit de la souris par le LBD d'après (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995) et adapté de (Bastien and Rochette-Egly, 2004). Les 12 hélices sont indiquées et colorées du bleu au rouge de l'extrémité N-terminale à C-terminale. La liaison du ligand (dont l'emplacement est approximativement indiqué par  $\star$ ) induit un changement de conformation avec notamment l'hélice H12 qui vient se refermer sur la poche du ligand.

### 2.2.3. Mécanisme d'activation dit de « la souris »

Les structures des LBDs du RXR $\alpha$  non ligandé ou apo (Bourguet et al., 1995) et du RAR $\gamma$  holo lié à l'acide rétinoïque tout-trans (Renaud et al., 1995) ont permis de proposer le modèle du mécanisme d'activation de la transcription par le LBD dit de la « souris » (Wurtz et al., 1996). La fixation du ligand induit une compaction de la structure du LBD et un important changement conformationnel affectant principalement les hélices H3, H11, H12 et

la boucle reliant H1 à H3. L'hélice H11 va se repositionner dans la continuité d'H10 et la boucle H1-H3 vient s'appliquer sous la poche du ligand. Le changement conformationnel le plus remarquable concerne H12, qui dans la forme apo est complètement exposée au solvant et qui suite à la fixation du ligand vient se retourner sur le cœur du LBD et ainsi refermer la poche de liaison du ligand. Ce changement conformationnel génère de nouvelles surfaces et est crucial pour activer le récepteur.

## **2.3. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires et sa régulation**

### **2.3.1. Mécanisme général**

Le modèle d'action d'un récepteur nucléaire est généralement représenté par un récepteur cytoplasmique inactif en complexe avec des protéines de choc thermique (Pratt and Toft, 1997), qui une fois activé par la fixation de son ligand transloque dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles. Bien que ce modèle soit vrai pour certains récepteurs aux hormones stéroïdiennes, la plupart des récepteurs nucléaires sont localisés dans le noyau et sont souvent liés à l'ADN en absence de leur ligand. Il est également reconnu, que des récepteurs nucléaires en absence de ligand, comme par exemple TR et RAR (Horlein et al., 1995), agissent comme répresseurs de la transcription. Les récepteurs nucléaires liés à l'ADN, en absence de ligand ou en réponse à la liaison de ligands antagonistes ou agonistes, vont réprimer ou activer la transcription par le biais du recrutement de gros complexes multiprotéiques au niveau du promoteur de leur gènes cibles. Plusieurs protéines corégulatrices recrutées par des récepteurs nucléaires ont été identifiées (pour une revue voir (Glass and Rosenfeld, 2000; Kraus and Wong, 2002; McKenna et al., 1999), parmi lesquelles certaines sont activatrices (coactivateurs), alors que d'autres sont répressives (corépresseurs).

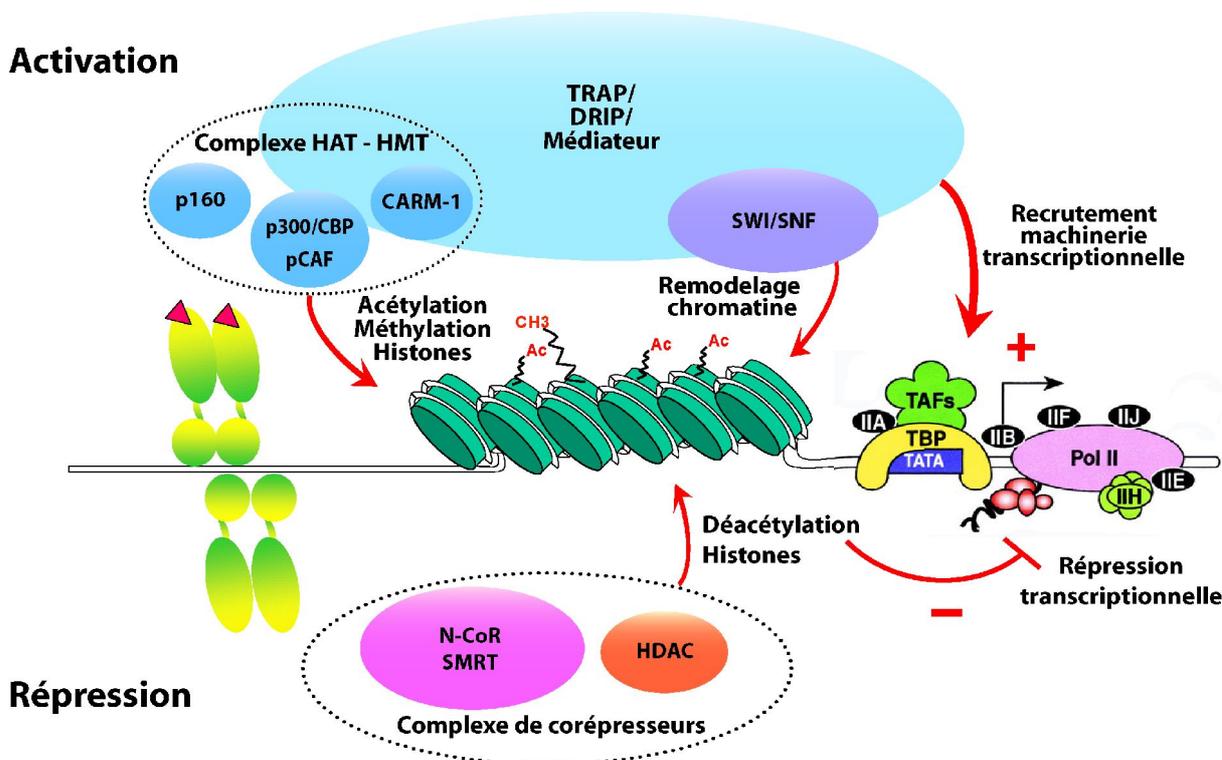
### **2.3.2. Le recrutement de coactivateurs et l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires**

Lors de la liaison du ligand, le LBD des récepteurs nucléaires subit un changement conformationnel important (voir chapitre 2.2.3. et Figure 8). Les nouvelles surfaces générées par ce changement permettent la dissociation des corépresseurs et le recrutement des coactivateurs. Le repositionnement de H12 induit par la fixation du ligand agoniste génère une surface hydrophobe à la surface du LBD. Ce sillon hydrophobe est généralement formé par des résidus des hélices H3, H4, et H12. Des motifs LxxLL (L pour leucine, et x pour un résidu quelconque) présents chez des coactivateurs (coactivateurs de la famille SRC/p160 tels que

GRIP et SRC-1 ; et p300/CBP...) sont responsables de l'interaction avec les récepteurs nucléaires et ont donc été nommés NR box (Nuclear Receptor box) (Darimont et al., 1998; Feng et al., 1998; Shiau et al., 1998). La séquence LxxLL des coactivateurs adopte une structure en courte hélice  $\alpha$  qui va venir s'amarrer dans le sillon hydrophobe créé à la surface du LBD. Il existe une réelle complémentarité de surface entre la structure du peptide LxxLL et celle du sillon. De plus, deux résidus chargés très conservés dans la superfamille des récepteurs nucléaires (une lysine et un glutamate, localisés respectivement dans H3 et H12) forment une « pince électrostatique » qui stabilise l'interaction de l'hélice LxxLL avec le LBD par des liaisons hydrogènes avec le squelette du peptide. La fonction d'activation dépendante du ligand AF-2, qui avait été initialement localisée au niveau de l'hélice H12 et qui est définie comme impliquée dans la liaison et la reconnaissance de coactivateurs est en fait plus étendue et inclut tous les résidus formant ce sillon hydrophobe. L'hélice H12 est déterminante pour l'AF-2 mais n'est pas suffisante. Certains coactivateurs se lient à l'AF-1, d'autres à l'AF-2 et d'autres encore aux deux régions AF-1 et 2 (Warnmark et al., 2003).

L'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires ligandés et liés à leur élément de réponse requiert l'action de différents complexes multiprotéiques coactivateurs qui semble agir de façon séquentielle, combinatoire et/ou parallèle (Glass and Rosenfeld, 2000; Kraus and Wong, 2002). Parmi ces complexes coactivateurs, se trouvent des complexes qui vont modifier les histones. Certains possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) et vont acétyler les histones, tels que P300/CBP (CREB Binding Protein), P/CAF (P300/CBP Associated Factor), et la famille de coactivateurs p160. D'autres possèdent une activité histone méthyltransférase (HMT) et vont méthyler les histones, comme par exemple CARM-1 (coactivator-associated arginine methyltransferase). Ces complexes, en modifiant les queues des histones, desserrent la structure des nucléosomes et rendent les gènes plus accessibles pour la transcription. D'autres complexes possédant des activités de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP (SWI/SNF) entrent en jeu, et provoquent une ouverture de la chromatine fortement condensée et produisent un environnement transcriptionnel permissif au niveau du promoteur qui est nécessaire à l'activation de la transcription. De plus, le complexe multiprotéique TRAP (TR-Associated Proteins) / DRIP (vitamin D receptor Interacting Proteins) / Médiateur interagit et forme un pont entre les récepteurs et les facteurs de transcription généraux, accélérant l'entrée de la machine transcriptionnelle (ARN polymérase II et facteurs de transcription généraux) dans le complexe de préinitiation (Figure 9).

En plus des protéines décrites ci-dessus fonctionnant comme HAT, HMT, remodeleurs, et médiateurs, de nombreux autres coactivateurs avec diverses fonctions ont été décrits (McKenna et al., 1999). Par exemple, les protéines HMG-1 et 2 (High Mobility Group), qui lient l'ADN en induisant une courbure et qui accroissent la liaison à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux stéroïdes (Boonyaratanakornkit et al., 1998). Un autre coactivateur très surprenant a été identifié, SRA (Steroid Receptor RNA Activator) qui agit sélectivement comme coactivateur de l'AF-1 des récepteurs stéroïdiens, et qui diffère des autres coactivateurs dans sa nature car c'est un transcrit d'ARN et non une protéine (Lanz et al., 1999).



**Figure 9 : Activation et répression de la transcription par les récepteurs nucléaires adapté d'après (Glass and Rosenfeld, 2000).** Les récepteurs nucléaires recrutent plusieurs complexes de corégulateurs. En présence du ligand, ils activent la transcription et ils recrutent des facteurs qui vont remodeler la chromatine (SWI/SNF), acétyler (p160, p300/CBP, pCAF) ou métyler (CARM-1) les histones et contacter les facteurs de transcription généraux (TRAP/DRIP/Médiateur). En absence de ligand, les récepteurs nucléaires répriment la transcription et recrutent des corépresseurs (N-CoR, SMRT) qui vont recruter des HDAC ou interférer avec les facteurs de transcription généraux.

### 2.3.3. Le recrutement de corépresseurs et la répression de la transcription par les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires peuvent réprimer l'expression de certains gènes d'une manière passive, *via* la compétition avec d'autres facteurs de transcription pour la liaison à des sites de l'ADN, ou *via* des interactions directes avec d'autres facteurs de transcription et ceci indépendamment de la liaison du récepteur à l'ADN (Karin, 1998).

Cependant, des récepteurs nucléaires en absence de ligand et liés à l'ADN sont capables de réprimer activement la transcription de gènes cibles en recrutant des corépresseurs tels que NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors). Ce recrutement fait intervenir des motifs LxxxIxxx(I/L) des corépresseurs qui sont conservés et qui sont similaires au motif LxxLL des coactivateurs (Jepsen and Rosenfeld, 2002). Cependant, le motif LxxxIxxx(I/L) forme trois tours d'hélice  $\alpha$  et est donc plus étendu (un tour d'hélice supplémentaire) que le motif des coactivateurs. Le motif des corépresseurs se fixe sur un sillon hydrophobe formé à la surface du LBD qui est partiellement chevauchant avec le sillon d'interaction avec les coactivateurs (Xu et al., 2002). Le tour d'hélice  $\alpha$  supplémentaire du motif du corépresseur se prolonge dans l'espace libéré par le repositionnement d'H12 et empêche cette hélice de se replier dans sa configuration active. Si un ligand vient se fixer sur le récepteur, il va induire le changement conformationnel décrit dans la figure 12 qui va générer de nouvelles surfaces, provoquer le départ de corépresseurs et permettre ainsi le recrutement de coactivateurs. L'échange dynamique, dépendant du ligand, des corépresseurs pour les coactivateurs sert d'interrupteur et permet de passer de la répression à l'activation de la transcription.

Les corépresseurs fonctionnent principalement en recrutant des protéines ayant une activité histone déacetylase (HDAC) qui permet de maintenir la chromatine dans un état de répression de la transcription. Les différents corépresseurs et les différentes HDACs semblent former plusieurs complexes, dont certains possèdent aussi des activités de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP. Les corépresseurs agissent *via* de multiples mécanismes avec de nombreux partenaires incluant des HDACs et l'appareil de transcription afin d'aboutir à une forte répression de la transcription (Figure 9).

Deux corépresseurs ont été assez bien caractérisés : NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors) (pour une revue sur les corépresseurs voir (Burke and Baniahmad, 2000). N-CoR et SMRT servent de corépresseurs à de nombreux récepteurs nucléaires tels que v-ErbA, RevErb, COUP-TF, et ER et PR liés à des antagonistes. Cependant, plusieurs autres corépresseurs ont été identifiés : Alien (Dressel et al., 1999), RIP140 (Cavailles et al., 1995),

REA (Estrogene Receptor Activity) (Montano et al., 1999), SUN-CoR (Small Unique Nuclear receptor CoRepressor) (Zamir et al., 1997), Zip 67 (zinc finger protein 67 KDa) (Borud et al., 2003), ainsi que deux corépresseurs avec un mécanisme d'action particulier qui sont Hr (Hairless) et LCoR (Ligand dependent CoRepressor). En effet, Hr a été identifié comme corépresseur du récepteur orphelin constitutivement actif ROR  $\alpha$  (Retinoic acid receptor related Orphan Receptor  $\alpha$ ). Hr présente un mode de répression particulier de ROR  $\alpha$ , puisqu'il interagit avec ROR  $\alpha$  par le biais de deux motifs LxxLL qui sont considérés généralement comme motif d'interaction avec des coactivateurs. De plus, l'hélice H12 de ROR  $\alpha$  semble importante pour cette interaction avec Hr (Moraitis et al., 2002). Quant à LCoR, c'est un corépresseur qui recrute les récepteurs liés à des agonistes à travers un motif LXXLL (Fernandes et al., 2003).

#### 2.3.4. Modifications des récepteurs nucléaires et régulation de leur mécanisme d'action

Le niveau d'expression, ainsi que la fonction des protéines doivent être constamment ajustés et sont donc extrêmement régulés. Concernant l'expression des protéines, l'initiation de la transcription, de même que le traitement de l'ARN, son transport, puis la traduction et le repliement des protéines sont soumis à une stricte régulation. L'activité des protéines est ensuite contrôlée par la régulation de leur localisation et leur demi-vie. De plus, la fonction des protéines est aussi modulée rapidement par des modifications post-traductionnelles qui consistent en l'attachement aux protéines de divers groupements : méthyl, phosphoryl, acétyl... Les récepteurs nucléaires, mais aussi leurs corégulateurs et les histones, peuvent subir diverses modifications post-traductionnelles qui vont modifier leur activité : ubiquitination, sumoylation, acétylation, méthylation et phosphorylation (Baek and Rosenfeld, 2004).

La phosphorylation par différentes kinases de résidus dans les domaines A/B, C et E a été démontrée. En règle générale, la (ou les) phosphorylation coopère avec l'hormone pour atteindre le niveau maximal d'activation transcriptionnelle. Cependant, il a été montré qu'elle pouvait atténuer et même terminer la réponse au ligand en excluant les récepteurs du complexe de transcription, en réduisant leur affinité de liaison au ligand ou en induisant leur dégradation par la voie ubiquitine-protéasome (Rochette-Egly, 2003).

L'ubiquitination est la conjugaison à un substrat de l'ubiquitine, un polypeptide de 76 résidus. La mono-ubiquitination est impliquée dans la régulation transcriptionnelle, alors que la poly-ubiquitination est impliquée dans des voies de dégradation des protéines.

L'ubiquitination de plusieurs récepteurs nucléaires a été reportée, et notamment ER, AR, PPAR $\alpha$ , GR, RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  et TR sont régulés par le système ubiquitine-protéasome (Baek and Rosenfeld, 2004).

La sumoylation est une modification identifiée récemment qui consiste en la conjugaison d'un petit polypeptide appelé SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) à des résidus lysine spécifiques des protéines cibles qui produit divers effets. Le récepteur aux androgènes est sumoylé et cette sumoylation est importante pour son activité de répression (Nishida and Yasuda, 2002). Au contraire, la sumoylation du récepteur aux glucocorticoïdes augmente son activité transcriptionnelle et régule sa stabilité (Le Dren et al., 2002).

L'acétylation de plusieurs récepteurs nucléaires tels que AR et ER $\alpha$  a été reportée. L'acétylation de ER $\alpha$  contribue à l'atténuation de l'activation transcriptionnelle (Wang et al., 2001), alors que dans le cas de AR elle est importante pour la transactivation dépendante du ligand (Fu et al., 2003).

L'activité des récepteurs nucléaires peut être finement régulée directement, mais aussi indirectement via des modifications de leurs corégulateurs et de leur niveau d'expression. De plus, elle intègre aussi les informations provenant d'autres voies de signalisation.

## **2.4. Localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires**

### **2.4.1. Le transport nucléocytoplasmique des protéines en général**

Les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme, puis afin d'exercer leurs fonctions, certaines resteront dans le cytoplasme alors que d'autres seront transportées dans le noyau. La régulation de la localisation intracellulaire des protéines est donc très importante car elle permet de réguler leur fonction. Le noyau et le cytoplasme sont séparés par une double membrane qui comprend des ouvertures ou pores nucléaires. Les petites protéines peuvent diffuser à travers les pores nucléaires par libre diffusion. Les protéines de taille supérieure à 40-60 kDa peuvent rentrer dans le noyau seulement par mode actif. Cependant, l'entrée dans le noyau de petites protéines peut être aussi active (Pour des revues sur le transport nucléocytoplasmique voir (Gorlich and Kutay, 1999; Gorlich and Mattaj, 1996; Nigg, 1997). Des séquences responsables de l'import nucléaire ont été identifiées et appelées signaux de localisation nucléaire ou NLS. Un NLS classique est constitué de un ou plusieurs groupes d'acides aminés basiques. Un exemple d'un tel NLS est celui de l'antigène grand T du virus simien 40 (SV40) dont la séquence est : PKKKRKV. Ce NLS est capable lorsqu'il est

fusionné à une protéine cytoplasmique de la relocaliser dans le noyau. Le mécanisme d'import implique l'interaction du NLS avec l'importine  $\alpha$  qui est présente dans le cytoplasme sous forme de dimère avec l'importine  $\beta$ . Ce complexe va s'amarrer au pore nucléaire et est transloqué à travers le pore nucléaire par un mécanisme dépendant de l'énergie qui requiert l'intervention de la protéine Ran qui est un membre la famille Ras de petites GTPases (guanosine triphosphatase). Une fois dans le noyau, la protéine contenant le NLS se dissocie du complexe.

En ce qui concerne l'export nucléaire, des séquences responsables de l'export nucléaire ont été identifiées et appelées signaux d'export nucléaire ou NES. Les NES « classiques » sont des séquences courtes d'acides aminés hydrophobes contenant des leucines, comme par exemple le NES de la protéine virale Rev : LPPLERLTL. L'export de protéines contenant un NES fait intervenir l'exportine Crm1 (chromosome region maintenance 1) et Ran. L'existence de la leptomycine B qui est une substance bloquant spécifiquement Crm1 a permis d'étudier ce type d'export.

Des protéines capables d'entrer et de sortir du noyau et donc de circuler entre le noyau et le cytoplasme ont été identifiées. Ce type de circulation est aussi appelé navette ou « shuttling ». Un exemple est hnRNP A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1), une protéine impliquée dans l'export de l'ARN, qui possède une séquence de 38 acides aminés appelée M9 qui est responsable de cette activité de « shuttling ». L'import d'hnRNP A1 implique une protéine apparentée à l'importine  $\beta$  appelée transportine. Le mécanisme d'export n'a pas été encore caractérisé. La distribution de protéines circulant constamment entre le noyau et le cytoplasme à un moment donné dépend du rapport import/export nucléaire, et de l'affinité de liaison relative pour des partenaires nucléaires ou cytoplasmiques.

Plusieurs types de signaux ont été caractérisés, cependant, il existe diverses voies de transport nucléocytoplasmique avec probablement certaines restant à définir.

#### 2.4.2. La localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires

Il est généralement considéré que les récepteurs nucléaires sont mobiles et sont capables d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme. Ce fut démontré notamment pour ER, GR, RAR, PR, TR et VDR (Guiochon-Mantel et al., 1991; Maruvada et al., 2003). Leur localisation observée à un moment donné reflète donc un équilibre entre l'import et l'export nucléaire. Il est généralement admis que les récepteurs nucléaires présentent un ou

plusieurs NLS constitutifs dans les régions C-D et un NLS inductible par le ligand dans le domaine E, ces deux types de NLS semblant coopérer (Gronemeyer and Laudet, 1995). Une région du DBD a été identifiée comme importante pour l'export de plusieurs récepteurs nucléaires (GR, AR, ER, LXR (Liver X Receptor), PR, RAR, RevErb, RXR, TR, VDR). Cependant cette région ne contient pas de NES riche en leucine et ne fait pas intervenir Crm1. Elle est aussi importante pour que le récepteur fasse la navette entre les deux compartiments (Black et al., 2001).

La localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires peut être modifiée par la présence ou non d'hormones (tableau 1) et est sujette à quelques controverses. En effet, les résultats obtenus s'accordent sur la localisation nucléaire en présence de ligand, mais ils diffèrent légèrement sur la localisation en absence de ligand pour certains récepteurs. Aux différentes études utilisant des expériences d'immunofluorescence et d'immunohistochimie, se sont ajoutées des études utilisant des fusions avec des protéines fluorescentes comme la GFP (Green Fluorescent Protein) qui permettent de suivre la localisation des protéines dans la cellule vivante. Voici ci-dessous une synthèse de la localisation de plusieurs récepteurs nucléaires en absence de leur ligand. Certains récepteurs sont localisés dans le noyau : ER (Htun et al., 1999; Kawata et al., 2001; Maruvada et al., 2003), RAR (Maruvada et al., 2003), PR (Lim et al., 1999) et VDR (Michigami et al., 1999). D'autres sont nucléo-cytoplasmique : MR (Fejes-Toth et al., 1998) ou majoritairement cytoplasmique : GR (Htun et al., 1996; Kawata et al., 2001). Avec AR et TR, des résultats légèrement différents ont été obtenus. AR est localisé principalement dans le noyau (Jenster et al., 1991) ou est nucléo-cytoplasmique dans le cadre d'une fusion avec GFP (Georget et al., 1997). TR $\beta$  est majoritairement nucléaire dans une étude (Baumann et al., 2001; Maruvada et al., 2003) ou majoritairement cytoplasmique dans une autre (Zhu et al., 1998).

	(-) ligand	(+) ligand
ER, PR, RAR, VDR	N	N
MR	N-C	N
GR	C	N

**Tableau 1 : Localisation intracellulaire de divers récepteurs nucléaires en absence (-) ou en présence (+) de leur ligand.** Les différents récepteurs nucléaires sont localisés dans le noyau (N) en présence de leur ligand. En leur absence, ils sont nucléaires (N), nucléocytoplasmique (N-C) ou cytoplasmique (C) suivant les cas.

La localisation de nombreux facteurs de transcription s'est révélée être régulée en réponse à l'activation de différentes voies de signalisation, ou stimulations et notamment par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, il a été montré que la protéine kinase B phosphoryle le facteur de transcription FKHR1, ce qui provoque son export dans le cytoplasme. La localisation des récepteurs nucléaires est elle aussi régulée par des modifications post-traductionnelles. En effet, il a été montré que JNK (c-jun N-terminal kinase) phosphoryle GR et augmente son export nucléaire après retrait du ligand (Itoh et al., 2002).

## **2.5. SF-1 ou l'exemple d'un « ancien orphelin »**

### **2.5.1. Généralités et structure**

SF-1 (steroidogenic factor-1) est aussi connu sous les noms Ad4BP (adrenal 4 binding protein) et NR5A1, et est considéré comme un facteur clé du développement et de la fonction des tissus stéroïdogènes. SF-1 est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires (pour une revue sur SF-1 (Val et al., 2003)). Il présente une région A/B très courte qui ne possède pas d'AF-1, et une région D. Son DBD est un domaine C classique avec deux doigts de zinc, et SF-1 se lie à l'ADN sous forme de monomère. La structure du domaine E ou LBD de SF-1 a été récemment résolue grâce à sa cristallisation par deux équipes (Krylova et al., 2005; Li et al., 2005). Le LBD de SF-1 adopte le repliement canonique des récepteurs nucléaires et possède une poche de liaison du ligand très large qui est rempli par un phospholipide endogène bactérien (les protéines sont exprimées chez les bactéries). L'une des études mentionne la présence d'un phospholipide qui est un phosphatidyl éthanolamine avec deux acides gras dont la taille varie de C12 à C16 et qui peut être facilement échangé avec un ligand exogène. Un phospholipide avec des acides gras plus long (C18) agit comme antagoniste (Li et al., 2005). La seconde étude révèle la présence d'un phosphatidyl glycérol avec deux acides gras C16 et 18 (Krylova et al., 2005). Elle montre aussi que SF-1 peut lier des phospholipides eucaryotiques, les phosphatidyls inositols bi et tri-phosphate (PIP 2 et 3). L'hélice H12 est repliée dans sa conformation active et est contactée directement par le phospholipide. De plus, l'évidence que l'activité de SF-1 est bien régulée par un ligand est apportée par la perte d'interaction avec des coactivateurs et la baisse d'activation transcriptionnelle provoquées par des mutations de résidus constituant la poche du ligand. Le recrutement de coactivateurs par SF-1 peut être augmenté ou inhibé par des phospholipides et ceci selon la taille de leurs acides gras. Ces résultats ont donc suggéré un rôle de SF-1 dans la

régulation de la balance phospholipides / stérol. Cependant, il a été supposé qu'en plus du ligand, des modifications post-traductionnelles et le niveau de corégulateurs présents pourraient moduler le niveau d'activité de SF-1. Ainsi, l'augmentation du nombre de molécules de corépresseurs (par exemple DAX-1) pourrait outrepasser l'activation ligand-dépendante et rendre le récepteur inactif (Krylova et al., 2005).

### 2.5.2. Sites d'expression, modèle animal et mutations chez l'Homme

SF-1 est exprimé dans les testicules, les ovaires, le cortex surrénalien, l'hypophyse et le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMH) dès l'apparition de leurs précurseurs et jusqu'à l'âge adulte (Ikeda et al., 1996; Val et al., 2003). Son expression a aussi été reportée dans la peau (Patel et al., 2001) et la rate (Ramayya et al., 1997). SF-1 est détecté dans le primordium adrénogénital à E9 chez la souris, et aussi dans les ébauches génitale et surrénalienne lorsqu'elles se séparent. Puis, dans les surrénales, l'expression de SF-1 est restreinte au cortex.

Des animaux dont le gène *sf-1* a été invalidé ont été générés (Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995). Les animaux *sf-1*<sup>-/-</sup> meurent rapidement après la naissance, et présentent une absence totale des glandes surrénales, des gonades, du VMH, ainsi que la persistance de canaux de Muller indépendamment du sexe génétique. SF-1 est donc un facteur essentiel pour la formation des surrénales et des gonades.

A ce jour, 6 mutations du gène *SF-1* ont été identifiées chez l'Homme et sont associées à des syndromes de réversion sexuelle et dans certains cas seulement d'hypoplasie ou d'agénésie des glandes surrénales (Jameson, 2004). En effet, trois patients présentent une insuffisance surrénalienne (Achermann et al., 1999; Achermann et al., 2002; Biason-Lauber and Schoenle, 2000). Parmi les trois patients ayant une fonction surrénalienne normale, deux sont hétérozygotes pour une mutation abolissant toute expression de SF-1 (Hasegawa et al., 2004; Mallet et al., 2004) et un est hétérozygote pour une mutation exerçant un effet dominant négatif (Correa et al., 2004). Les cinq patients males génétiquement (XY) présentent une réversion sexuelle male-femelle. Une seule femme présente une mutation hétérozygote de *SF-1* et une insuffisance surrénalienne avec une fonction ovarienne apparemment normale (Biason-Lauber and Schoenle, 2000). Un patient possède des structures mullériennes persistantes (Achermann et al., 1999) et d'autres présentent des dysgénésies ou régressions testiculaires. Ces mutations provoquent divers phénotypes très variables qui soulignent l'action dose-dépendante de SF-1. De plus, il est probable que ces phénotypes soient

influencés par d'autres facteurs génétiques. Seul un patient présente un phénotype comparable à celui des souris *sf-1*<sup>-/-</sup> avec une réversion sexuelle complète, une persistance des canaux de Muller et une insuffisance surrénalienne (Achermann et al., 1999). Les autres divergent avec certains ne présentant pas d'insuffisance surrénalienne. La caractérisation et l'identification de nouvelles mutations de *SF-1* chez l'Homme, ainsi que l'invalidation du gène *sf-1* chez différentes souches de souris permettraient probablement de mieux comprendre la diversité de ces phénotypes.

### 2.5.3. Fonction d'activateur transcriptionnel réprimée par DAX-1

SF-1 est considéré comme un activateur clé de la fonction stéroïdogène et agit à différents niveaux. Tout d'abord, SF-1 est nécessaire pour l'expression du récepteur à l'ACTH qui stimule la stéroïdogénèse surrénalienne (Naville et al., 1999). De plus, SF-1 régule la délivrance du cholestérol à différents niveaux, comme par exemple par son activation de l'expression de StAR. Enfin, SF-1 participe à l'expression de toutes les enzymes stéroïdogènes dans le cortex surrénalien et les gonades (Val et al., 2003). SF-1 est aussi impliqué dans la détoxification de l'isocaproaldéhyde qui est libéré suite au clivage du cholestérol par la P450<sub>scc</sub> en régulant l'expression de l'enzyme responsable de sa dégradation, AKR1B7 (Aigueperse et al., 2001).

L'activité de SF-1 est régulée par des modifications post-traductionnelles, et notamment la phosphorylation (Desclozeaux et al., 2002; Hammer et al., 1999), l'acétylation (Jacob et al., 2001) et la sumoylation (Komatsu et al., 2004).

DAX-1 est un facteur essentiel dans la régulation de la fonction de SF-1. En effet, DAX-1 et SF-1 ont une distribution d'expression tissulaire similaire qui est concentrée sur l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales/gonades (Ikeda et al., 1996). Ils sont tous les deux importants pour la formation et la fonction des différents composants de cet axe. DAX-1 est considéré comme un répresseur global, et SF-1 comme un activateur de la stéroïdogénèse, et ils sont donc considérés comme antagonistes. De plus, DAX-1 réprime la transactivation par SF-1 (voir chapitre 3.9.3.).



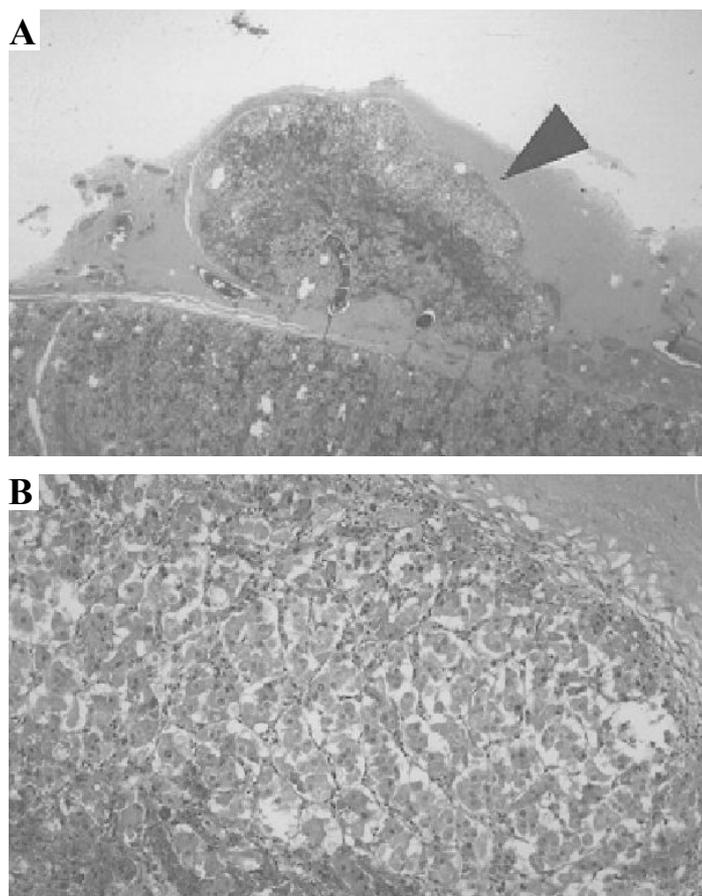
### 3. DAX-1

#### **3.1. Le gène *DAX-1*, l'AHC et l'HGG**

L'hypoplasie surrénalienne congénitale ou AHC « Adrenal Hypoplasia Congenita » est une maladie caractérisée par un faible développement des glandes surrénales qui se manifeste par une insuffisance surrénalienne primaire dont les principales caractéristiques sont : hyponatrémie, hyperkaliémie, hypoaldostéronémie, hypocortisolémie, taux élevé d'ACTH et taux faible de 17-hydroxyprogestérone. Les symptômes sont principalement : nausées, vomissements, état de faiblesse, diarrhées et hypotension. L'AHC est létale par déshydratation si elle n'est pas traitée rapidement et sa fréquence est de 1/12500 naissances.

Il existe deux formes d'AHC : une forme autosomique récessive miniature et une forme cytomégalique liée au chromosome X. En ce qui concerne la forme autosomique, il n'y a pas encore de gènes identifiés comme responsables (Phelan and McCabe, 2001). La forme liée à l'X est répertoriée sous le numéro 300200 dans la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>). L'AHC se manifeste généralement dans les premières semaines ou années de la vie et en moyenne à 3 semaines. Quelques cas à manifestation plus tardive (20 et 28 ans) ont cependant été décrits (Voir paragraphe 3.2. sur les mutations du gène *dax-1*).

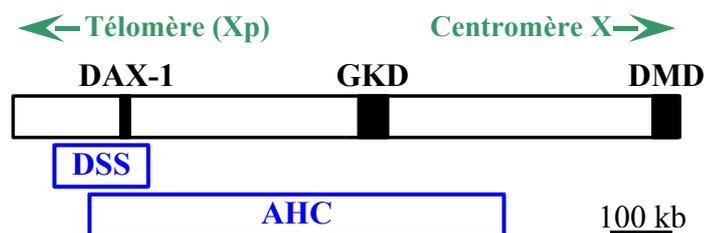
L'AHC liée à l'X est caractérisée par une désorganisation structurale de la glande et une absence de formation des différentes zones caractéristiques de la corticosurrénale adulte. La surrénale hypoplasique ressemble à une surrénale fœtale avec peu ou pas de zone permanente du cortex surrénalien et des cellules larges, cytomégaliées et vacuolisées ressemblant aux cellules fœtales. Un exemple de surrénale hypoplasique est présenté en Figure 10, qui montre des coupes de surrénales d'un enfant de 19 jours qui avait une hypoplasie surrénalienne et toutes les caractéristiques de l'AHC liée à l'X, et qui est décédé à la suite d'une septicémie et d'une hyperkaliémie (Lekawanvijit et al., 2002). On constate notamment que les glandes surrénales sont de petite taille, et que le cortex surrénalien est peu développé et irrégulièrement fin. A plus fort grossissement, on constate l'absence de zone permanente et les cellules corticales sont cytomégaliées et ressemblent à des cellules fœtales.



**Figure 10 : Coupes de surrénales hypoplasiques** (d'après (Lekawanvijit et al., 2002). **A.** Grossissement (X10). La glande surrénale (flèche) est de petite taille et le cortex surrénalien est peu développé et irrégulièrement fin. **B.** A plus fort grossissement (X100), la zone permanente est absente et les cellules corticales sont cytomégaliqes et ressemblent à des cellules de la zone fœtale.

Le gène de l'AHC liée à l'X a été localisé dans une région du bras court du chromosome X, grâce à l'identification de patients avec des délétions chromosomiques et un syndrome de gènes contigus : AHC ; Déficit en Glycérol Kinase (GKD) ; Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Ce gène a été identifié en 1994 et nommé *DAX-1* pour « **D**SS-**A**HC critical region on the **X**-chromosome, gene **1** » (Zanaria et al., 1994). En effet, le gène *DAX-1* est situé dans l'intervalle critique DSS (Dosage-Sensitive Sex reversal) qui est une région de 160kb sur le bras court du chromosome X dans la portion Xp21 (Bardoni et al., 1994). Les patients (XY) qui possèdent des duplications de cette région présentent une réversion sexuelle plus ou moins importante avec certains individus considérés comme des femmes et présentant des organes génitaux externes femelles ou ambigus. La délétion de cette même région chez des patients (XY) n'affecte cependant pas leur phénotype. Le gène *DAX-1* est constitué de deux exons séparés par un intron de 3,4kb. Il est localisé en Xp21 et est

télomérique aux gènes *GKD* et *DMD* (l'ordre est : Xp télomère-DAX-1-GKD-DMD-Centromère). Le gène *DAX-1* est situé dans les régions DSS et AHC (Figure 11).



**Figure 11** : Localisation des gènes *DAX-1*, *GKD* et *DMD*, et des régions critiques DSS et AHC sur le bras court du chromosome X adapté d'après (Zanaria et al., 1994). Abréviations : GKD (Glycerol Kinase Deficiency) ; DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) ; AHC (Adrenal Hypoplasia Congenita) ; DSS (Dosage-Sensitive Sex reversal).

A l'heure actuelle, il n'y a pas de données précises ni sur l'incidence ni sur la prévalence de l'AHC due à des mutations de *DAX-1*, d'autres entités cliniques ressemblant à l'AHC liée à l'X sans anomalie de *DAX-1* pouvant être comptabilisées en excès. Le traitement de l'AHC consiste en la supplémentation en minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes (Orphanet-<http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-DAX-1.pdf>).

L'AHC liée à l'X est associée à l'hypogonadisme hypogonadotrope (HHG) qui apparaît chez tous les patients ayant survécus jusqu'à l'adolescence grâce à un traitement substitutif avec des stéroïdes surrénaliens (Yu et al., 1998a). Les mutations de *DAX-1* sont responsables à la fois de l'AHC et de l'HHG (Muscatelli et al., 1994). L'HHG est caractérisée par un sous-développement des gonades et un défaut ou une faible synthèse d'hormones gonadotropes. Les symptômes de l'HHG sont une puberté retardée, la stérilité et des concentrations plasmatiques faibles d'hormones gonadotropes FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone). La base moléculaire et génétique de la plupart des cas (90%) d'HHG n'est pas connue (Layman, 1999). Le déficit en hormones hypophysaires observé dans les cas d'HHG due à des mutations de *DAX-1*, est sélectif pour les gonadotropes FSH et LH car la production d'autres hormones hypophysaires telles que l'ACTH (Adrenocorticotropie Hormone), la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone), la PRL (prolactine) et la GH (Growth Hormone) est normale. L'HHG due à des mutations de *DAX-1* est provoquée par un dysfonctionnement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Cependant il a été montré une grande variabilité des phénotypes de l'HHG et du niveau de l'altération de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, certains patients présentent un déficit uniquement hypophysaire, d'autres hypophysaire et hypothalamique et à différents degrés (Habiby et al.,

1996). Tous les hommes présentant une mutation du gène *DAX-1* avec une AHC qui ont atteint l'âge adulte ont aussi présenté une HHG. De plus, il a été montré que les patients présentant un AHC/HHG ont des anomalies de production de sperme, et de morphologie et physiologie testiculaire avec beaucoup de cas de cryptorchidie (absence de descente testiculaire). Ce qui suggère un rôle important de *DAX-1* pour la fonction testiculaire (pour une revue sur *DAX-1* voir (Lalli and Sassone-Corsi, 2003). Le traitement de l'HHG consiste en une supplémentation en testostérone (Orphanet-<http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-DAX-1.pdf>).

### **3.2. Mutations du gène *DAX-1* identifiées chez les patients avec AHC-HHG**

L'AHC/HHG liée à l'X affecte seulement des garçons et les femmes hétérozygotes ne sont généralement pas affectées mais porteuses. Cependant, quelques cas de femmes affectées ont été décrits. Une étude identifiant une mutation de *DAX-1* (décalage du cadre de lecture et introduction d'un codon stop en position 263) chez deux garçons avec une AHC-HHG a révélé que trois femmes de la même famille, hétérozygotes pour cette mutation présentaient un délai de puberté (Seminara et al., 1999). Il a aussi été montré un cas de femme homozygote pour une mutation de *DAX-1* (172X), présentant seulement un HHG et apparemment une fonction surrénalienne normale, alors que ses deux frères avaient une AHC. Chez cette femme, l'homozygotie est certainement due à une conversion génique et l'on peut supposer qu'un mosaïcisme non détecté ainsi que des facteurs épigénétiques ont affecté la pénétrance du phénotype dans cette famille (Merke et al., 1999). Un seul cas de femme atteinte d'AHC liée à l'X a été décrit et celle-ci présentait une délétion de gènes contigus (Bartley et al., 1982). Ces phénotypes peuvent être dus à une haploinsuffisance ou à une inactivation non aléatoire du chromosome X.

A ce jour, 89 mutations du gène *DAX-1* ont été identifiées (Voir annexe 2 et pour une revue (Phelan and McCabe, 2001)). 47% (42/89) sont des mutations qui entraînent un décalage du cadre de lecture et donc un changement de résidus et l'apparition d'un codon stop prématuré. Ce sont des délétions ou des insertions de nucléotides probablement dues pour une part à des erreurs de mésappariement non corrigées lors de la réplication de l'ADN. Les mutations non-sens représentent 28% (25/89) des mutations identifiées. Ces mutations provoquent le changement d'un codon codant en codon stop et donc l'arrêt prématuré de la traduction. Les mutations faux-sens représentent 21% des mutations (19/89) et provoquent le changement d'un seul résidu. Elles affectent toutes des résidus du domaine carboxy-terminal

de la protéine et semblent être regroupées dans des régions du domaine carboxy-terminal et localisées dans son cœur hydrophobe (voir paragraphe 3.7. sur la protéine DAX-1). Une seule affectant le domaine amino-terminal (C200W) a été identifiée chez une femme qui présentait un AHC, mais toutefois ce résultat n'a jamais été publié et on trouve seulement une citation dans l'article de (Phelan and McCabe, 2001) comme référence à une présentation lors du meeting annuel de la société d'endocrinologie à Toronto en 2000. Je n'ai donc pas pu juger ce résultat et j'ai donc préféré exclure ces données. Deux mutations de type délétion de codon et donc n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture ont été reportées, elles provoquent respectivement la délétion du résidu 269 ( $\delta V269$ ) et des résidus 381 à 385 ( $\delta [L381-K382-G383-T384-V385]$ ). Un cas de réarrangement génique complexe du gène *DAX-1* a été décrit, qui provoque la délétion de 2,2kb couvrant entièrement le second exon et une insertion de 27pb, aboutissant à la production d'une protéine de 429 résidus dont les résidus 1-389 sont de DAX-1 puis ceux de 390 à 429 sont des résidus non apparentés à DAX-1 (Salvi et al., 2002).

Il n'y a pas de corrélation entre le génotype et le phénotype pour la majorité des mutations de *DAX-1* et ceci est probablement dû à l'influence des facteurs génétiques et environnementaux. De plus, l'âge d'apparition des symptômes d'AHC peut être extrêmement variable même chez des patients avec la même mutation. Par exemple, deux patients avec une mutation aboutissant à l'introduction d'un codon stop en position 171 qui présentent des symptômes d'AHC, l'un à l'âge d'une semaine, et l'autre à 7 ans (Phelan and McCabe, 2001). Toutes les mutations identifiées à ce jour semblent être des mutations perte de fonction et aucune mutation gain de fonction n'a été identifiée. Elles altèrent ou tronquent le domaine carboxy-terminal et sont associées à des phénotypes d'AHC/HHG divers mais sévères. Seules trois mutations ont été associées à un phénotype tardif avec une apparition de l'AHC à 20 et 28 ans, un HHG moins sévère et une faible perte de fonction de la protéine. Ce sont les mutations : I439S (Tabarin et al., 2000), Y380D (Mantovani et al., 2002; Tabarin et al., 2000) et Q37X (qui aboutit à la production d'un isoforme tronqué en amino-terminal de DAX-1 84-470 à partir d'un site alternatif d'initiation de la traduction) (Ozisik et al., 2003).

### **3.3. Les homologues identifiés chez d'autres espèces**

Des gènes homologues de *DAX-1* ont été isolés chez des mammifères, des reptiles, des oiseaux, mais pas chez des organismes inférieurs tels que *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*. Plus précisément, des homologues de *DAX-1* ont été identifiés chez les espèces suivantes : souris (Bae et al., 1996; Swain et al., 1996), rat, plusieurs espèces de primates (Patel et al., 2001a), cochon (Parma et al., 1997), wallabi (marsupial) (Pask et al.,

1997), poulet (Smith et al., 2000), alligator (Western et al., 2000), grenouille (Sugita et al., 2001), poisson (Wang et al., 2002). Les protéines DAX-1 chez la souris et l'Homme possèdent 66,5% d'identité et 76,3% de similitude (Swain et al., 1996). La protéine DAX-1 présente chez le cochon possède 77,9% d'identité et 84,7% de similitude avec la protéine humaine (Parma et al., 1997). Le domaine carboxy-terminal (C-ter) de DAX-1 est conservé à travers les différentes espèces, alors que le domaine amino-terminal (N-ter) est conservé seulement chez les Mammifères, et est absent ou présent sous la forme d'une seule répétition chez les vertébrés non-mammifères (poulet, alligator, grenouille, poisson) (Wang et al., 2002).

### **3.4. Les sites d'expression de DAX-1**

J'ai fait ici la synthèse de l'expression de DAX-1 chez l'Homme et chez la souris au cours du développement et jusqu'à l'âge adulte. La distribution d'expression de DAX-1 chez ces deux espèces est parallèle et est concentrée principalement dans les tissus de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales/gonades. Les homologues de DAX-1 identifiés chez d'autres espèces sont aussi exprimés dans les gonades mâles et femelles au cours du développement.

#### **3.4.1. Au cours du développement et à l'âge adulte chez l'Homme**

Chez l'embryon humain en cours de développement, DAX-1 apparaît au 33<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E) dans la crête urogénitale (qui est à l'origine des gonades, des reins et des surrénales). Puis dans la crête génitale, l'expression de DAX-1 reste à un niveau similaire chez les deux sexes jusqu'à 18 semaines de grossesse (Hanley et al., 2000). Dans l'ébauche des surrénales, DAX-1 est exprimé partout dans le cortex et à 18 semaines de gestation il est présent dans les zones définitive, transitoire et foetale (Hanley et al., 2001).

Chez l'Homme adulte, l'expression de DAX-1 a été reportée dans différents tissus : antéhypophyse, hypothalamus, testicule, ovaire, cortex surrénalien (Guo et al., 1995), et la peau (Patel et al., 2001b). Au niveau de la corticosurrénale, DAX-1 est exprimé dans les trois zones : glomérulée, fasciculée et réticulée (Shibata et al., 2001). Aucune expression n'a été observée dans le placenta, le foie et les reins (Guo et al., 1995).

#### **3.4.2. Au cours du développement chez la souris**

Chez la souris, les précurseurs des cellules qui vont former les surrénales et les gonades apparaissent dans la crête urogénitale qui se développe à partir du mésonéphros à partir du E10. La crête génitale est morphologiquement identique chez le mâle et la femelle jusqu'à E11,5. A ce stage, elle est composée de cellules germinales et d'une partie somatique qui sera à l'origine des cellules de Sertoli et de Leydig dans le testicule, ou des cellules des follicules ou de la thèque de l'ovaire (Swain et al., 1996).

L'expression de DAX-1 apparaît à E10,5 dans la crête urogénitale (Kawabe et al., 1999). A E11,5, elle est détectée dans la partie somatique de la crête génitale chez les deux sexes. A E12, des différences morphologiques peuvent être observées entre les gonades mâles et femelles. Après cette date, une expression de DAX-1 sexuellement dimorphe a été reportée par deux études chez la souris et une chez le rat qui présentent certaines différences qui peuvent provenir de l'utilisation de différentes souches d'animaux, ou de techniques ayant des niveaux de sensibilité différents. Swain et collaborateurs ont montré que l'expression de DAX-1 diminue fortement chez le mâle quand les cordes testiculaires commencent à apparaître vers E12,5 et la diminution est observée jusqu'à E14,5, alors que chez la femelle dax-1 continue d'être exprimé dans la gonade de E12,5 à 16,5 (Swain et al., 1996). Une autre étude a montré que l'expression de DAX-1 dans les gonades à E11,5 est légèrement plus élevée chez le mâle que chez la femelle. Puis, dans l'ovaire, l'expression de DAX-1 augmente nettement à E12,5, reste haute jusqu'à E14,5, et diminue à E17,5. L'expression dans le testicule reste au même niveau de E11,5 à E14,5 puis augmente pour atteindre un niveau plus élevé que celui observé dans l'ovaire à E17,5 (Ikeda et al., 2001). Une troisième étude utilisant des rats, a montré que dans les ovaires et testicules, l'expression de l'ARNm de DAX-1 est détectée à un niveau similaire à E13,5 et E15,5, alors qu'à E18,5 elle est plus élevée dans le testicule et plus faible dans l'ovaire (Nachtigal et al., 1998).

Le primordium surrénalien se développe dans la région antérieure dorsale de la crête urogénitale à environ E11,5. DAX-1 est exprimé tout au long du développement des surrénales et est détecté dès E12,5 (Swain et al., 1996). L'expression de DAX-1 dans l'ébauche surrénalienne de E16,5 au jour post-natal (P) 14 est identique chez le mâle et la femelle, mais présente un dimorphisme sexuel à partir de la période pubertale jusqu'à l'âge adulte. En effet, elle diminue fortement chez le mâle, alors que chez la femelle elle reste constante. L'étude immunohistochimique, révèle aussi un motif d'expression identique chez le mâle et la femelle à P14 qui devient différent après P28 (Mukai et al., 2002).

L'expression de DAX-1 a aussi été démontrée dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMH) et l'hypophyse au cours du développement dès E9,5 (Ikeda et al., 2001). Elle est reportée aussi plus tard au cours du développement et chez des souris nouveaux-nés dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse et le VMH (Kawabe et al., 1999; Kawajiri et al., 2003; Swain et al., 1996).

DAX-1 est aussi exprimé dans des cellules embryonnaires souches totipotentes de souris (Clipsham et al., 2004).

#### 3.4.3. A l'âge adulte chez la souris

Chez la souris adulte, DAX-1 est exprimé à tous les niveaux de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales/gonades et plus précisément : l'antéhypophyse, le VMH, les cellules de Sertoli et de Leydig du testicule, les cellules de la granulosa et de la thèque de l'ovaire, et le cortex surrénalien (Ikeda et al., 1996; Kawabe et al., 1999; Kawajiri et al., 2003; Swain et al., 1996). Une étude a reporté une expression de DAX-1 par RT-PCR dans d'autres tissus de souris : le thymus, le cœur, les poumons, les reins, la rate, et le système nerveux central (Bae et al., 1996). L'expression de DAX-1 dans les cellules de Sertoli de testicules de rat est régulée au cours du développement et de la spermatogenèse (Tamai et al., 1996).

Chez la souris adulte, on observe une différence dans les sites d'expression de DAX-1 dans la surrénale. Chez la femelle sexuellement mature (à P56 et P72), DAX-1 est exprimé dans les zones glomérulée, fasciculée et réticulée, alors que chez le mâle l'expression est restreinte à la zone glomérulée (Mukai et al., 2002). Une autre étude a montré l'expression de DAX-1 dans des surrénales de rat adulte principalement dans la zone glomérulée qui présente le plus fort marquage, et plus faiblement dans les zones fasciculée et réticulée, mais le sexe des animaux utilisés n'a pas été précisé (Kawabe et al., 1999).

### **3.5. Les modèles animaux**

Des souris dont le gène *Dax-1* est invalidé ont été générées (ou plus précisément le second exon du gène *dax-1* a été excisé). Il a été surprenant de constater que ces souris ne présentent pas d'hypoplasie surrénalienne et que leur taux d'hormones surrénaliennes est normal. La seule anomalie observée est l'absence de régression à la maturité sexuelle de la zone X, qui est considérée comme équivalente à la zone fœtale chez l'Homme, mais qui chez la souris apparaît après la naissance et régresse lors de la puberté chez le mâle et de la

première grossesse chez la femelle. DAX-1 semble donc important pour la régression de la zone fœtale chez l'Homme et la souris, mais contrairement à l'Homme, chez la souris DAX-1 n'est pas nécessaire pour la formation du cortex définitif et fonctionnel. Les souris Dax-1<sup>-/-</sup> femelles ont un développement ovarien et une maturation sexuelle normaux, et sont fertiles. Par contre, chez les souris Dax-1<sup>-Y</sup> mâles on observe une anomalie testiculaire. Ces souris sont hypogonadiques avec une dégénération progressive de l'épithélium germinal testiculaire et sont stériles (sans dysfonctionnement de production d'hormones gonadotropes FSH et LH, et en présence d'une production de testostérone pendant le développement embryonnaire et post-natal suffisante pour permettre la formation des organes génitaux mâles). DAX-1 est essentiel pour la maintenance de l'intégrité de l'épithélium germinal et la gamétogenèse chez l'adulte (Yu et al., 1998c). De plus, une étude récente a montré que DAX-1 semble nécessaire précocement pour la formation des cordes testiculaires. En effet, chez les souris Dax-1<sup>-Y</sup> à E13,5, les cordes testiculaires sont désorganisées et incomplètement formées (Meeks et al., 2003a).

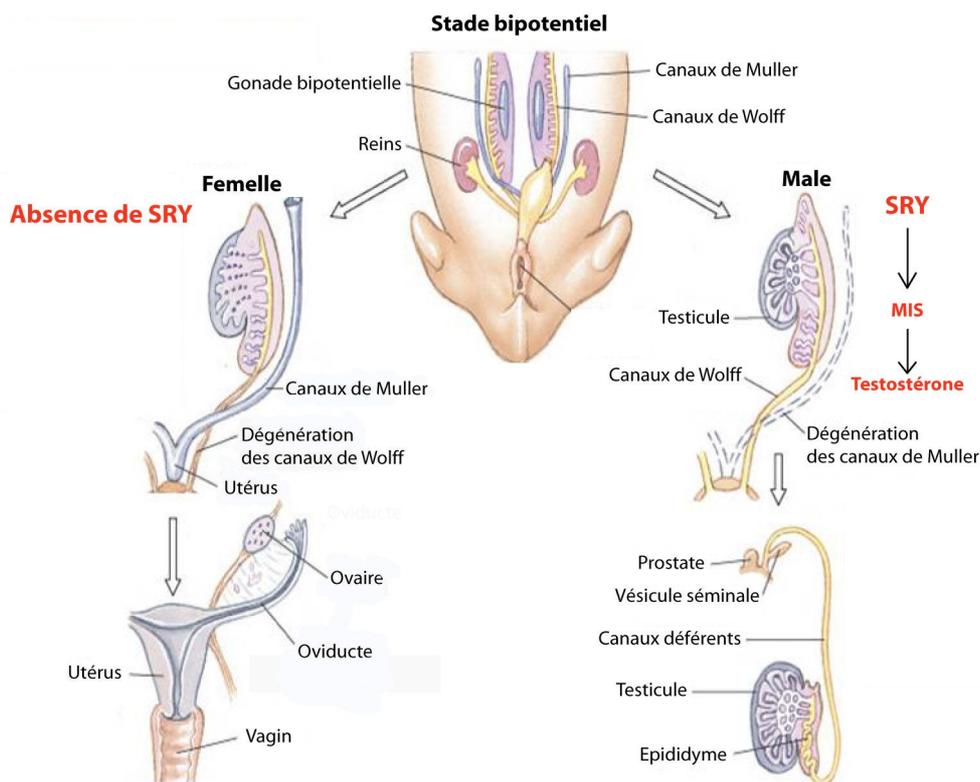
L'analyse des souris dont le gène *Dax-1* a été invalidé a fourni des résultats surprenants avec notamment une absence de phénotype surrénalien. Ces animaux ne sont donc pas un bon modèle pour l'étude de l'AHC. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence de phénotype entre les souris Dax-1<sup>-/-</sup> et les patients porteurs de mutations de *DAX-1*. Les protéines DAX-1 chez la souris et l'Homme possèdent seulement 66,5% d'identité et 76,3% de similitude (Swain et al., 1996). La formation du cortex surrénalien chez l'Homme et les primates supérieurs est très différente des autres espèces et notamment des rongeurs. De plus, seule la délétion de l'exon 2 (qui code pour les derniers 37% du domaine C-terminal) a été réalisée et il est donc probable qu'il persiste un transcrit tronqué à partir de l'exon 1 (qui code pour le domaine N-terminal et 67% du domaine C-terminal), et notamment les isoformes A et  $\alpha$  récemment identifiés (voir chapitre 3.7) qui peuvent interférer dans les résultats (Ho et al., 2004; Hossain et al., 2004).

Différentes lignées de souris transgéniques ont été créées afin de mieux comprendre le rôle de DAX-1 dans la formation des gonades. Des souris transgéniques, qui surexpriment un fragment d'ADN génomique contenant le gène *Dax-1* ont été générées. Leur étude a révélé que des niveaux élevés d'expression de DAX-1 exogène retarde la différenciation testiculaire chez des souris XY possédant un allèle *Sry* (sex-determining region Y chromosome) « normale ». Par contre, chez des souris possédant un allèle *Sry* « faible » (allèle *poschiavinus* ou transgène *sry*), la surexpression de DAX-1 entraîne la réversion sexuelle mâle en femelle

de quelques, mais pas de tous les animaux XY (Swain et al., 1998). De plus, des croisements ont été effectués entre des animaux où le gène *Dax-1* était inactivé avec des animaux porteurs de l'allèle *Sry* « faible *poschiavinus* » (pos). Les souris obtenues  $Dax-1^{-/Y\text{ pos}}$  présentent toutes une réversion du sexe et ont un phénotype femelle alors que les souris  $XY^{\text{pos}}$  sont mâles (Meeks et al., 2003b). Ces résultats sont discutés dans le paragraphe suivant.

### **3.6. Rôle de DAX-1 dans la détermination du sexe**

Je vais tout d'abord faire un rappel sur les premières étapes de la différenciation sexuelle. A un stade de développement précoce chez les Mammifères, la crête génitale indifférenciée est similaire chez les embryons XX et XY. A ce stade bipotentiel, deux structures composées de deux paires de canaux génitaux associés avec les gonades indifférenciées sont présentes : les canaux de Muller qui ont le potentiel de se développer en oviductes, utérus et vagin supérieur, et les canaux de Wolff qui sont les ébauches de l'épididyme, vésicules séminales et canaux déférents (Figure 12). Chez l'embryon XY, l'expression du facteur testiculaire déterminant SRY est critique et va enclencher la détermination du sexe mâle et notamment la formation des testicules. Les cellules fœtales testiculaires de Sertoli s'assemblent en cordes testiculaires et commencent à synthétiser la MIS (Müllerian inhibiting substance) qui va provoquer la régression des canaux de Muller. Puis, les cellules de Leydig vont produire de la testostérone qui va induire la différenciation des canaux de Wolff en organes reproductifs mâles. Dans le cas d'embryons XX où SRY est absent, la MIS ainsi que la testostérone ne sont pas produites, les canaux de Wolff régressent donc et la différenciation des canaux de Muller se met en place pour former les organes reproductifs femelles. Les facteurs : Sox9 (SRY-related HMG-box 9) ; SF-1 (steroidogenic factor 1) ; WT1 (Wilm's tumor-associated gene 1) ; GATA 4 ; Wnt 4 et DAX-1 sont importants pour le développement précoce des gonades comme le suggèrent leur expression dans les gonades au cours du développement, ainsi que des pathologies humaines provoquées par des mutations de leur gène, et/ou des phénotypes d'animaux knock-out ou transgéniques (Swain and Lovell-Badge, 1999).



**Figure 12 : Différenciation sexuelle et formation des organes génitaux internes.** Au stade bipotentiel, deux types de structure sont présentes : les canaux de Muller et de Wolff. Chez le mâle, SRY est exprimé et va déclencher la synthèse de MIS (Müllerian inhibiting substance), puis de testostérone qui vont provoquer la régression des canaux de Muller et la différenciation des canaux de Wolff. Chez la femelle, en l'absence de SRY, les canaux de Wolff vont régresser et les canaux de Muller se différencier.

Les sites d'expression de DAX-1 au cours du développement, ainsi qu'à l'âge adulte, de même que le phénotype des patients atteints d'AHC et des différentes souris KO et transgéniques laissent suggérer un rôle de DAX-1 dans la détermination du sexe.

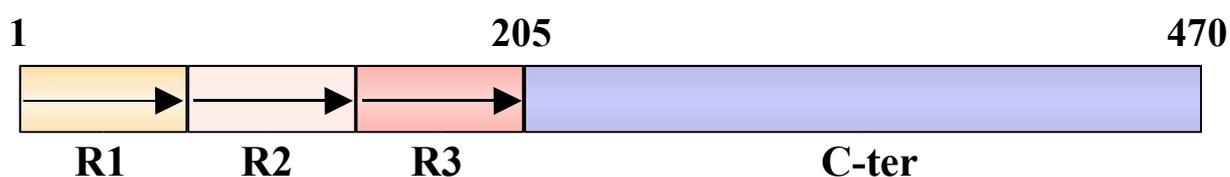
En effet, les patients (XY) qui possèdent des duplications du locus DSS présentent une réversion sexuelle plus ou moins importante alors que la délétion de cette même région chez des patients (XY) n'affecte cependant pas leur phénotype mâle (Bardoni et al., 1994). Ces observations suggèrent qu'un ou plusieurs gènes présents dans la région DSS n'est pas indispensable au développement testiculaire normal, mais qu'un double dosage de ce ou ces gènes interfère avec la formation des testicules. Ces observations avec celle de la réversion sexuelle observée chez des souris surexprimant DAX-1 et porteuses de l'allèle faible et retardée « pos » de *Sry*, ont amené à considérer DAX-1 comme un gène « anti-testiculaire », antagoniste de SRY (Swain et al., 1998). En effet, dans ces deux cas, une surexpression de DAX-1 semble bloquer la formation testiculaire.

Cependant l'inactivation de l'expression de DAX-1 chez les souris *dax-1*<sup>-Y pos</sup> porteuses de l'allèle faible *Sry* interfère avec la formation testiculaire et entraîne une réversion du sexe (Meeks et al., 2003b). De plus, les patients avec AHC et HHG, mais aussi les souris *dax-1*<sup>-Y</sup> présentent des anomalies testiculaires et sont stériles. L'absence de DAX-1 peut alors aussi empêcher la formation testiculaire. DAX-1 a donc été considéré comme « pro-testiculaire ». L'observation de tous ces résultats pousse à penser que DAX-1 a différentes actions à différents temps et lieux, et qu'il agit dans des fenêtres d'activité restreintes (Ludbrook and Harley, 2004).

Quant au phénotype DSS, des facteurs génétiques autres que *DAX-1* semblent intervenir. En effet, la région critique DSS inclut d'autres gènes, notamment certains qui codent pour des membres de la famille MAGE (melanoma antigen gene family) qui sont des antigènes associés à des tumeurs, et dont l'action pourrait se combiner à celle de DAX-1 pour aboutir au phénotype observé.

### **3.7. La protéine DAX-1, modèle d'homologie structurale et isoformes**

La protéine encodée par le gène *DAX-1* est composée de 470 acides aminés et à une taille d'environ 50 kDa. Des essais de cristallisation de DAX-1 sont en cours, mais non hélas pas encore aboutis. Des recherches (avec la séquence des acides aminés de DAX-1), dans les différentes bases de données protéiques ont permis d'identifier une structure particulière de la protéine DAX-1 (Figure 13). DAX-1 peut être divisée en deux régions, une N-terminale et une C-terminale.

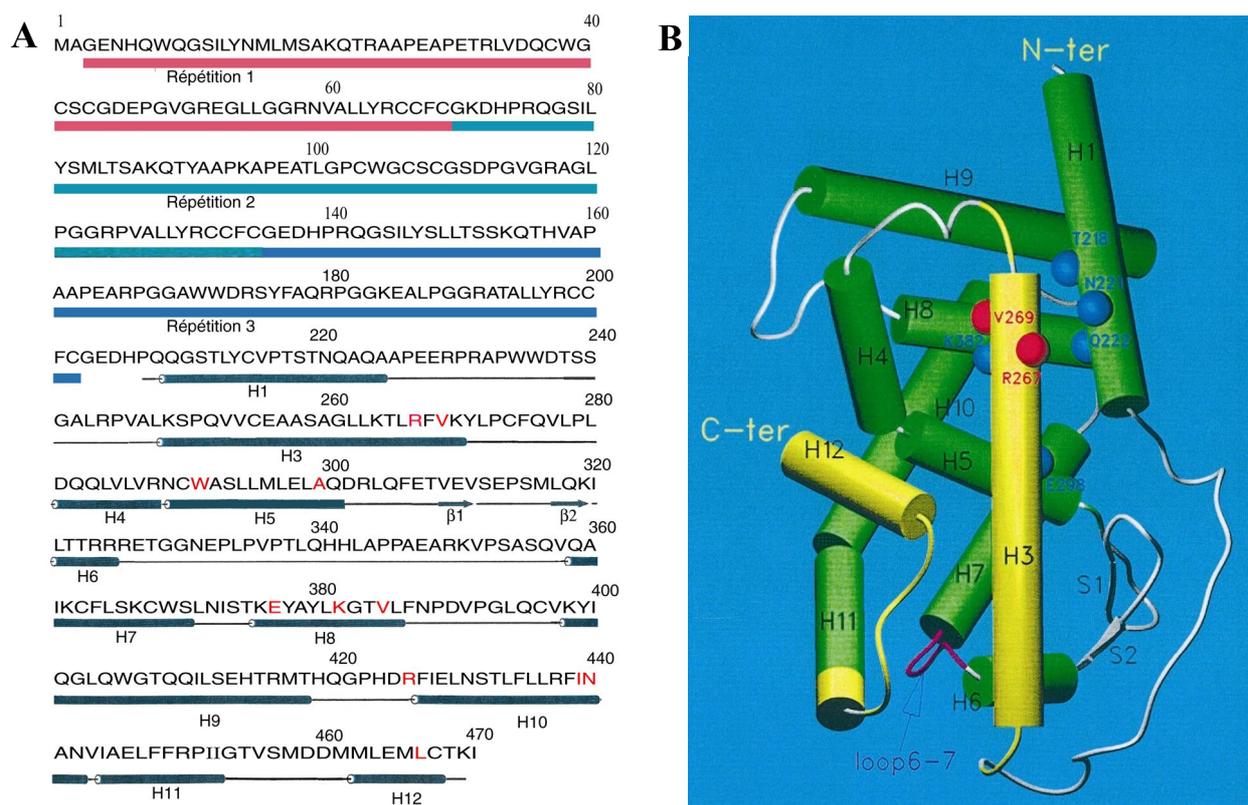


**Figure 13 :** Représentation schématique de la structure de la protéine DAX-1. R1, R2, et R3 représentent les trois répétitions du motif amino-terminal, et C-ter le domaine carboxy-terminal.

Le domaine N-terminal peut être divisé en trois répétitions d'un motif de 65 à 69 acides aminés. Des recherches extensives dans les bases de données n'ont pas révélées d'homologie avec aucun motif protéique connu.

Le domaine C-terminal présente une homologie avec le domaine de liaison du ligand (LBD) des récepteurs nucléaires. DAX-1 fait donc partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et est aussi nommé NR0B1 (Committee, 1999). La séquence du domaine C-terminal de DAX-1 possède 20% d'identité et 35% de similitude avec RXR $\alpha$  humain, et 16% d'identité et 29% de similitude avec RAR $\gamma$  humain. Le membre de la superfamille qui présente la plus forte similitude (41%) avec le domaine C-terminal de DAX-1 est SHP (Small Heterodimer Partner), qui comme DAX-1 ne présente pas la structure modulaire classique des récepteurs nucléaire et conserve seulement le domaine E ou LBD (Seol et al., 1996).

Des modèles d'homologie de la structure du domaine C-terminal de DAX-1 ont été réalisés à partir des structures des récepteurs : apo-RXR $\alpha$  (Retinoid X Receptor  $\alpha$  lié au ligand), holo-RAR $\gamma$  (Retinoid Acid Receptor  $\gamma$  sans ligand) et TR $\alpha$  (Thyroid hormone Receptor  $\alpha$ ) (Lalli et al., 1997; Zhang et al., 1998). Ces modèles du domaine C-terminal de DAX-1 ont révélé la conservation de résidus hydrophobes formant le cœur de la structure des récepteurs nucléaires et ont suggérés toutes les caractéristiques du repliement classique des récepteurs nucléaires (voir Figure 14, ainsi que le chapitre 2.2. sur la structure des récepteurs nucléaires). Notamment un repliement en sandwich composé de trois couches d'hélices  $\alpha$  anti-parallèles. Des interactions hydrophobes entre des résidus clés des hélices H3, H4, H5, H8 et H9, de même que des interactions polaires stabilisent le repliement. DAX-1 présente quelques caractéristiques intéressantes, telles qu'une longue insertion (une boucle de 26 acides aminés) entre les hélices H6 et H7 (qui n'est pas présente chez la plupart des membres de la famille des récepteurs nucléaires et qui est conservée par DAX-1 chez l'Homme et la souris), l'absence de l'hélice H2 et la conservation d'un motif dans l'hélice H12 qui est important pour la transactivation ligand dépendante (Lalli et al., 1997).



**Figure 14 : Structure de la protéine DAX-1 (A) et modèle de la structure du domaine C-terminal de DAX-1 basé sur la structure du LBD de RAR $\gamma$  humain lié au ligand (B) d'après (Lalli et al., 1997). A. Les répétitions N-terminales sont représentées en rouge, vert et bleu. Les structures secondaires, hélices  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ , sont mentionnées en dessous de la séquence. Quelques résidus affectés par des mutations ponctuelles AHC sont indiqués en rouge. B. Les résidus essentiels contactant les hélices H1, H3, H5 et H8 sont représentés par des sphères bleues. Deux résidus affectés par des mutations AHC (R267 et V269) sont indiqués par des sphères rouges. L'insertion de 26 résidus entre H6 et H7 est impossible à modéliser et une boucle correspondant à celle présente chez RAR a été représentée en violet.**

DAX-1 est considéré comme un récepteur orphelin car il n'a pas de ligand identifié. Un récepteur orphelin peut être considéré comme régulé par un ligand encore non identifié ou comme acteur constitutif n'étant pas influencé par un ou plusieurs ligands. Pour DAX-1, les deux hypothèses sont envisageables et seule la résolution de sa structure cristalline permettrait d'apporter une réponse. Récemment, deux récepteurs orphelins SF-1 et LRH-1 (liver receptor homolog-1) ont perdu leur statut d'orphelin. En effet, leurs structures cristallines ont été résolues et ont identifié des phospholipides comme ligands fonctionnels (Krylova et al., 2005; Li et al., 2005).

Il est considéré que la capacité de lier un ligand et de réguler l'activité du récepteur a été acquise au cours de l'évolution, et que les premiers récepteurs étaient orphelins (Laudet, 1997). Les mutations faux-sens identifiées chez les patients avec AHC semblent se regrouper dans le cœur ou noyau hydrophobe (H1, H3-H5-H6, H9, H10 et H11). Aucune n'a été

identifiée dans la région qui, par analogie avec les LBD de rTR apo (ligand lié) et hRXR, est prédite importante pour lier le ligand (Zhang et al., 1998). Ce résultat suggère que l'activité de DAX-1 n'est pas régulée par un ligand et qu'il est donc un vrai orphelin. Il a été postulé que la longue insertion entre les hélices H6 et H7 pourrait venir se replier dans la poche du ligand et ainsi la remplir. Ou peut-être que, comme c'est le cas pour Nurr1 et DHR38 (l'orthologue de Nurr1 chez la drosophile), DAX-1 n'a pas de cavité pour que le ligand puisse se loger. En effet, les récepteurs orphelins Nurr1 (Wang et al., 2003) et DHR38 (Baker et al., 2003) ont été cristallisés et leurs structures ont montré que leurs LBDs adoptent la conformation classique des récepteurs nucléaires, mais qu'il n'y a pas de cavité à l'endroit prédit de la poche du ligand, des chaînes latérales de larges résidus hydrophobes occupant la place. Ce sont les deux premiers exemples de récepteurs orphelins dont la fonction est vraiment indépendante du ligand.

Récemment, deux groupes ont rapporté l'existence de deux isoformes de DAX-1, nommés A et  $\alpha$ , produits par épissage alternatif à partir de l'exon 1 déjà caractérisé et d'un deuxième exon au sein de l'intron qui n'avait pas été identifié précédemment. Les deux groupes sont en désaccord sur le site d'épissage du nouvel exon et les deux nouveaux isoformes diffèrent seulement dans leurs résidus carboxy-terminaux, les 389 résidus amino-terminaux étant codés par l'exon 1 sont identiques. La protéine DAX-1 $\alpha$  est composée de 401 résidus, les 12 résidus carboxy-terminaux codés par l'exon 2 $\alpha$  sont spécifiques à DAX-1  $\alpha$  (Hossain et al., 2004). La protéine DAX1A possède 400 résidus dont les 11 derniers lui sont spécifiques (Ho et al., 2004). Les isoformes DAX-1 A et  $\alpha$ , sont principalement exprimés dans la surrénale, le cerveau, le rein, l'ovaire et le testicule. Contrairement à DAX-1, DAX-1  $\alpha$  a perdu son activité de répression transcriptionnelle et pourrait agir comme un antagoniste de DAX-1.

### **3.8. Régulation de l'expression de DAX-1**

L'expression de DAX-1 est tissu-spécifique, et est finement régulée au cours du temps, notamment pendant le développement. Ces observations suggèrent l'existence de différents facteurs intervenant pour réguler l'expression de DAX-1.

Tout d'abord, DAX-1 lui-même, peut se lier à une structure en épingle à cheveux présente dans son promoteur et réprimer sa propre expression (Zazopoulos et al., 1997). SF-1 (steroidogenic factor 1) joue un rôle important dans la régulation de l'expression de *dax-1* en se liant à au moins trois sites fonctionnels dans le promoteur de *dax-1* (Hoyle et al., 2002;

Kawabe et al., 1999; Vilain et al., 1997; Yu et al., 1998b). Cependant, SF-1 n'est pas essentiel car même si l'expression de DAX-1 est réduite chez les souris où le gène *sf-1* est inactivé, DAX-1 est toujours exprimé, ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs (Hoyle et al., 2002; Ikeda et al., 1996; Kawabe et al., 1999). WT1 (Wilm's tumor-associated gene 1) qui est comme DAX-1 exprimé dans les gonades au cours du développement, peut se fixer sur le promoteur (endogène et transfecté) et activer la transcription de *dax-1* (Kim et al., 1999). Wnt-4, un membre de la famille Wnt de facteurs de croissance secrétés, impliqué dans la détermination du sexe, est capable d'activer l'expression de *dax-1* endogène dans des cellules de Leydig et de Sertoli de souris transfectées (Jordan et al., 2001). De plus, l'expression de DAX-1 est activée par la  $\beta$ -caténine qui est une protéine transductrice du signal de la voie Wnt, et est diminuée dans les gonades embryonnaires femelles de souris où le gène *Wnt4* est inactivé (Mizusaki et al., 2003). Toutes ces données convergent pour démontrer la fonction activatrice de Wnt4 sur l'expression de DAX-1. COUP-TF (Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) est au contraire capable de réprimer l'expression de *dax-1* en se liant à son promoteur dans des cellules transfectées (Yu et al., 1998b). Enfin, la FSH (follicle stimulating hormone), à travers l'activation de la voie de l'AMPC (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique) inhibe l'expression de DAX-1 dans des cellules de Sertoli en culture (Tamai et al., 1996).

Facteurs activateurs	Facteurs répresseurs
SF-1, Wnt4, WT1	DAX-1, COUP-TF, FSH (AMPC)

**Tableau 2 :** Synthèse des facteurs régulant l'expression de DAX-1. Les différents facteurs activant (SF-1, Wnt-4 et WT1) et ceux réprimant (DAX-1, COUP-TF, FSH) l'expression de DAX-1 sont indiqués.

### **3.9. DAX-1, répresseur transcriptionnel et rôle post-transcriptionnel**

#### **3.9.1. Activité de répression intrinsèque de DAX-1 et liaison à l'ADN**

Dans tous les cas connus, DAX-1 agit comme répresseur transcriptionnel. Cette activité est localisée dans le domaine C-terminal qui possède une activité de répression intrinsèque. En effet, il est capable de réprimer la transcription dans des contextes hétérologues. Par exemple, lorsqu'il est fusionné avec le DBD de GAL4, le domaine C-ter de DAX-1 réprime l'expression du promoteur de la globine et de la thymidine kinase virale (tk) possédant des sites de liaison à GAL4, et ce dans plusieurs types cellulaires (Crawford et al., 1998; Lalli et al., 1997; Zazopoulos et al., 1997). Cette activité de répression

transcriptionnelle de DAX-1 est sévèrement affectée par plusieurs mutations ponctuelles identifiées chez des patients avec AHC (Achermann et al., 2001; Lalli et al., 1997).

DAX-1 est capable de se lier à l'ADN et plus particulièrement à des structures en épingle à cheveux sans forte spécificité de séquence. DAX-1 peut se lier à de telles structures dans son propre promoteur et dans le promoteur de StAR et réprimer l'expression de ces gènes (Zazopoulos et al., 1997). Il peut aussi se lier à des éléments de réponse de l'acide rétinoïque (RARE). DAX-1 se lie à l'ADN sous forme de monomères et ne forme pas d'hétérodimères avec RAR $\alpha$  et RXR $\alpha$  (Zanaria et al., 1994).

### 3.9.2. Répression globale de la stéroïdogénèse

DAX-1 a un effet global d'inhibiteur de la stéroïdogénèse. En effet, l'expression de DAX-1 dans la lignée cellulaire stéroïdogène Y-1 (cellules tumorales corticosurréaliennes de souris qui n'expriment pas DAX-1) bloque la production de stéroïdes. De plus, DAX-1 affecte la cascade stéroïdogène à différents niveaux en inhibant l'expression de StAR (Zazopoulos et al., 1997) et d'enzymes impliqués dans diverses étapes de la stéroïdogénèse telles que P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD (Lalli et al., 1998), P450<sub>arom</sub> (Gurates et al., 2003; Gurates et al., 2002), P450<sub>c17</sub> et 21 (Hanley et al., 2001). DAX-1 bloque aussi l'expression du gène *mvd*p (mouse vas deferens protein) en réponse à l'activation de la voie de l'AMPc (Aigueperse et al., 2001). Le gène *mvd*p code pour AKR1B7 qui détoxique l'isocaproaldéhyde qui est libéré suite au clivage du cholestérol par la P450<sub>scc</sub>.

### 3.9.3. Répression de la transactivation effectuée par SF-1 et d'autres facteurs

DAX-1 et SF-1 présentent une distribution d'expression tissulaire similaire et ils sont tous les deux essentiels pour la formation et la fonction surrénalienne et gonadique. L'interaction entre DAX-1 et SF-1 a été démontrée *in vitro* par « pull-down » avec des protéines traduites *in vitro* ou exprimées chez les bactéries (Ito et al., 1997; Nachtigal et al., 1998), par double hybride chez la levure (Nachtigal et al., 1998) et dans des cellules de mammifères (Crawford et al., 1998), et par « pull-down » avec une protéine de fusion avec SF-1 produite chez les bactéries et des extraits de cellules Y-1 (Sugawara et al., 2001). Cependant, cette interaction n'a pas été démontrée entre les deux protéines endogènes et *in vivo* dans la littérature et par différentes expériences effectuées dans notre laboratoire (Résultats non publiés). Toutefois, DAX-1 réprime la transactivation effectuée par SF-1. Par expérience de liaison *in vitro*, il a été montré que la fixation de SF-1 à son site de liaison de

l'ADN n'est pas interférée par DAX-1 (Ito et al., 1997). Cette activité de répression de DAX-1 sur la transactivation effectuée par SF-1 a été montrée pour plusieurs gènes : StAR (Zazopoulos et al., 1997), P450arom (Gurates et al., 2003; Gurates et al., 2002), P450c17 et 21 (Hanley et al., 2001), HDL-R (High-Density Lipoprotein-Receptor) (Lopez et al., 2001), inhibine  $\alpha$  (Achermann et al., 2001), LH $\beta$  (Luteinizing Hormone  $\beta$ ) (Dorn et al., 1999), MIS (Nachtigal et al., 1998; Tremblay and Viger, 2001), nNOS (neuronal Nitric Oxid Synthase) (Wei et al., 2002), RLF (Relaxin-Like Factor) (Koskimies et al., 2002).

DAX-1 bloque la transactivation effectuée par des facteurs autres que SF-1 et notamment, GATA-4, WT-1, SREBP-1a (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a) et Egr-1 (Early Growth Response-1). Pour certains promoteurs, DAX-1 bloque le synergisme entre SF-1 et différents partenaires qui est requis pour l'activation de la transcription. Par exemple, DAX-1 bloque le synergisme entre : SF-1 et WT-1 en interagissant seulement avec SF-1 (Nachtigal et al., 1998), mais aussi entre SF-1 et GATA-4 (Tremblay and Viger, 2001) dans le cas du promoteur de MIS ; SF-1 et Egr-1 dans le cas du promoteur de LH $\beta$  (Dorn et al., 1999). Dans le cas du promoteur de HDL-R, DAX-1 inhibe la transactivation par SF-1 et forme un complexe avec SF-1 sur l'ADN. De plus, DAX-1 réprime aussi la transactivation par SREBP-1a du promoteur HDL-R, en interagissant avec SREBP-1a et probablement en altérant sa liaison avec l'ADN (Lopez et al., 2001). DAX-1 réprime la transactivation du même promoteur (HDL-R) par deux facteurs en utilisant des mécanismes différents. Cependant, DAX-1 semble aussi agir selon un mécanisme SF-1 indépendant.

#### 3.9.4. Répression de la transactivation effectuée par divers récepteurs nucléaires

DAX-1, *via* différents mécanismes, fonctionne comme répresseur de divers récepteurs nucléaires : ER $\alpha$  et  $\beta$ , RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , AR, PR, Nur 77, LRH-1, ERR2 et FTZ-F1.

DAX-1 interagit et inhibe la transactivation de PR lié à un agoniste (Agoulnik et al., 2003), d'ERR2 (estrogen-receptor-related receptor 2 ou NR3B2) et de FTZ-F1 (NR5A3 ou l'homologue chez la mouche de SF-1 et LRH-1) (Suzuki et al., 2003). DAX-1 réprime l'activation de l'expression par LRH-1 de StAR et 3 $\beta$ -HSD2 (Kim et al., 2004; Peng et al., 2003) et il est capable d'interagir avec LRH-1 *in vitro* (pull-down et double hybride dans des cellules de mammifères) et peut réprimer son activation (fusion de GAL4-DBD avec le LBD de LRH-1) du promoteur tk (Suzuki et al., 2003). Dans le cas d'ER $\alpha$  et  $\beta$ , DAX-1 est capable d'interagir avec ces récepteurs *via* les motifs LxxLL présents dans son domaine N-terminal et de réprimer leur transactivation en présence de leur ligand (Zhang et al., 2000). Dans le cas

d'AR, c'est aussi *via* son domaine N-terminal, que DAX-1 interagit avec AR et il inhibe sa transactivation induite par le ligand, ainsi que la communication entre les AF1 et 2 (Holter et al., 2002). Pour le récepteur orphelin Nur77, c'est le domaine C-terminal de DAX-1 qui est nécessaire, et DAX-1 réprime la transactivation de Nur77 par compétition pour la liaison du coactivateur SRC-1 (Song et al., 2004). Pour RAR $\alpha$  et RXR $\alpha$ , DAX-1 réprime leur activation transcriptionnelle, probablement par compétition pour la liaison à l'ADN (Zanaria et al., 1994).

DAX-1 peut donc bloquer la transactivation de plusieurs récepteurs nucléaires à travers différents mécanismes : compétition pour la liaison à l'ADN, interaction faisant intervenir le domaine N ou C-terminal, compétition pour la liaison avec des coactivateurs probablement par occupation du site de liaison des coactivateurs *via* son motif Lxxll ou *via* un autre motif. De plus, on peut suggérer que DAX-1 peut recruter des corépresseurs, ou interagir directement avec des HDACs ou la machinerie transcriptionnelle.

Dans chaque répétition du domaine N-terminal de DAX-1 a été suggéré la présence d'un motif riche en leucines qui ressemble aux motifs LxxLL ou NR box des coactivateurs qui leur permettent d'interagir avec les récepteurs nucléaires. Récemment, il a été montré que ces motifs LxxLL de DAX-1 interagissent avec TR $\beta$  lors d'un essai de liaison *in vitro* à grande échelle, mais la signification fonctionnelle de cette interaction reste à démontrer (Moore et al., 2004). Une étude précédente a montré que DAX-1 n'influçait pas la transactivation de TR $\alpha$  et  $\beta$  en présence d'hormone de promoteurs contenant des sites de réponse aux hormones thyroïdiennes (Ito et al., 1997).

### 3.9.5. Recrutement de corépresseurs par DAX-1

Trois corépresseurs ont été reportés capable d'interagir avec DAX-1 : Alien, N-CoR et RIP140. Cependant, étant donné les résultats disponibles, ils ne peuvent pas être considérés formellement comme corépresseurs de DAX-1.

Alien interagit avec DAX-1 et cette interaction est abolie par les mutations AHC (Altincicek et al., 2000). Il a été montré que MLK2 (mixed lineage kinase 2), un partenaire d'Alien qui le phosphoryle et augmente sa capacité de répression, augmente aussi l'activité de répression de DAX-1 (Eckey et al., 2003). Cependant, cet effet peut être indirecte d'Alien, MLK2 qui est un activateur de JNK (c-JUN-N-terminal Kinase) pouvant provoquer d'autres

effets. Pour l'instant, il n'y a pas de preuve directe et formelle qu'Alien agit comme corépresseur de DAX-1.

L'interaction entre DAX-1 et N-CoR a été montrée par des expériences de co-immunoprécipitation de protéines traduites *in vitro* et de double hybride dans des cellules de mammifères. Cependant, et avec ces deux méthodes, l'interaction N-CoR / DAX-1 est beaucoup plus faible (20 fois) que N-CoR / RAR $\alpha$  en absence de ligand. Deux mutants AHC de DAX-1 n'interagissent plus avec N-CoR. SF-1 n'interagit pas avec N-CoR, mais si DAX-1 est présent il permet l'interaction SF-1 / N-CoR (par double hybride chez la levure). Ces résultats suggèrent que DAX-1 interagit avec N-CoR et qu'il recrute N-CoR vers SF-1. Cependant, il n'y a pas de démonstration formelle que N-CoR est nécessaire pour la répression de DAX-1 (Crawford et al., 1998).

RIP 140, qui a d'abord été identifié comme coactivateur, mais qui fonctionne aussi comme corépresseur interagit avec DAX-1. RIP 140 réprime l'expression de StAR en présence de SF-1. Cependant, l'effet de RIP140 sur la répression par DAX-1 n'est pas très clair dans cette étude et d'autres études fonctionnelles seraient nécessaires pour conclure (Sugawara et al., 2001).

SMRT a été écarté comme corépresseur potentiel de DAX-1, car aucune interaction avec DAX-1 n'a été observée dans deux études (Altincicek et al., 2000; Crawford et al., 1998).

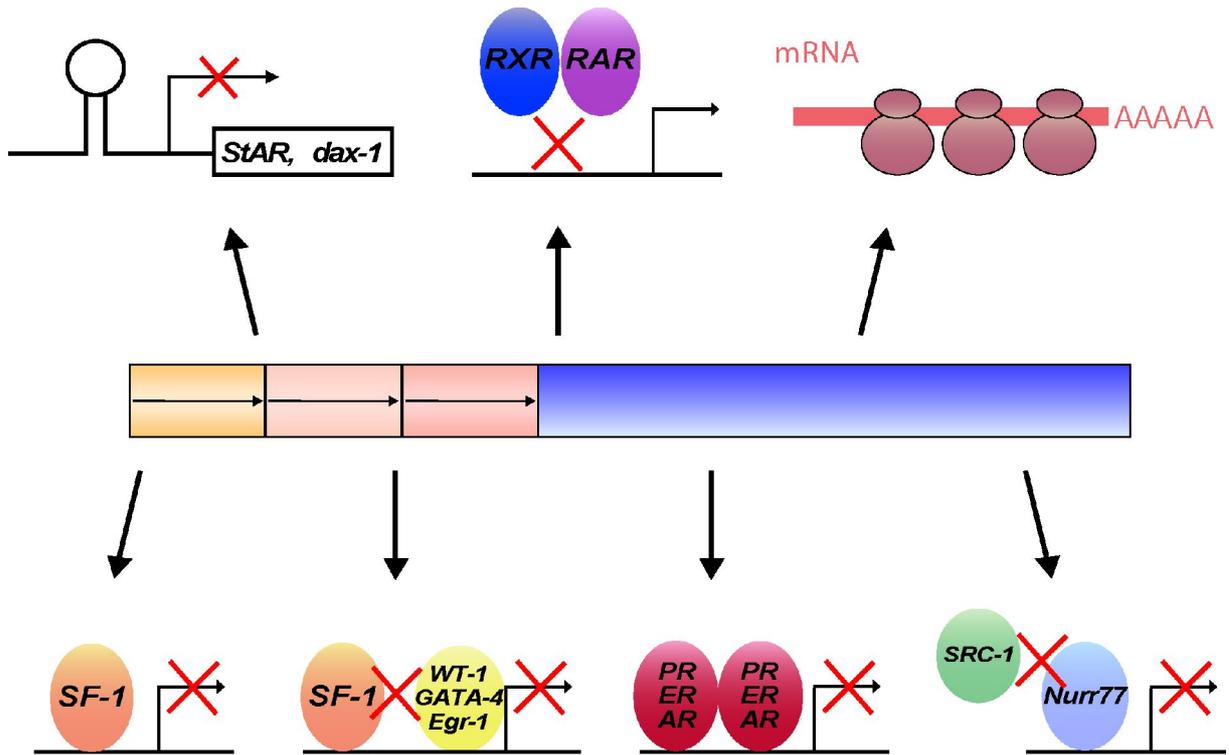
### 3.9.6. Rôle post-transcriptionnel de DAX-1

Le rôle de DAX-1 dans la régulation transcriptionnelle est clairement reconnu. De plus, une étude de notre laboratoire a montré que DAX-1 possède d'autres fonctions et est aussi capable d'agir au niveau post-transcriptionnel. En effet dans le cytoplasme, DAX-1 est complexé aux ARN polyA et est associé aux polyribosomes. La capacité de lier l'ARN est détenue par les domaines N et C-terminaux. Les trois répétitions du domaine N-terminal coopèrent pour permettre la liaison à l'ARN. Le domaine C-terminal est capable de lier l'ARN et dans le contexte de la protéine entière peut moduler et renforcer l'activité de liaison du N-terminal. L'étude de la capacité de liaison à l'ARN de mutants de DAX-1 identifiés chez des patients avec AHC a révélé qu'ils ont aussi perdus l'activité de liaison à l'ARN. Cette capacité de liaison à l'ARN du LBD est surprenante et de plus elle semble être partagée avec d'autres membres de la famille. En effet, RAR $\alpha$  et  $\gamma$  présentent aussi une liaison à l'ARN

(Lalli et al., 2000). Ces résultats suggèrent un rôle de DAX-1 dans le transport et le traitement de l'ARN et ouvrent d'intéressantes voies de recherche.

Les différents rôles de DAX-1 présentés dans ce dernier chapitre de la troisième partie de mon introduction (Chapitre 3.9) sont synthétisés dans la figure 15 qui reprend les différents mécanismes de la répression transcriptionnelle par DAX-1 et son rôle post-transcriptionnel. La liste des gènes dont l'expression est réprimée par DAX-1 est présente dans le tableau 3.





**Figure 15 :** Les différents modes de répression transcriptionnelle de DAX-1 et son rôle post-transcriptionnel. DAX-1 est un répresseur transcriptionnel utilisant différents modes d'action. DAX-1 se lie à des structures en épingle à cheveux des promoteurs de *Star* et *dax-1* et réprime l'expression de ces gènes. Il réprime la transactivation par RAR/RXR en interférant avec leur liaison à l'ADN. DAX-1 interagit avec SF-1 et réprime sa transactivation, il bloque aussi la synergie entre SF-1 et de nombreux facteurs (WT-1, GATA-4, Egr-1) nécessaire à l'activation de certains promoteurs. Il est capable d'interagir et de réprimer l'activation de nombreux récepteurs nucléaires (PR, ER, AR). DAX-1 via son domaine C-ter interagit avec Nur77 et réprime sa transactivation par compétition pour la liaison de coactivateur (SRC-1). De plus, l'interaction de DAX-1 avec des ARN poly A et son association avec des polyribosomes suggère un rôle post-transcriptionnel de DAX-1.

Gènes

---

*3β-HSD*  
*Dax-1*  
*HDL-R*  
*Inhibin α*  
*LHβ*  
*MIS*  
*Mvdp (AKR1B7)*  
*nNOS*  
*P450arom*  
*P450c17 et 21*  
*P450scc*  
*RLF*  
*StAR*

**Tableau 3 : Liste des gènes dont l'expression est réprimée directement ou indirectement par DAX-1.**

But du travail

## But du travail

Le but global de mon travail de thèse était de mieux caractériser DAX-1 et sa perte de fonction provoquée par les mutations identifiées chez des patients avec AHC, afin d'aboutir à une meilleure compréhension de l'AHC. Il s'est majoritairement orienté selon deux axes majeurs : la distribution intracellulaire de DAX-1 et son activité de répression.

Lorsque j'ai débuté mon travail de thèse, on venait de découvrir que DAX-1 était localisé dans le noyau et le cytoplasme et était capable de faire la navette entre les deux compartiments (Lalli et al., 2000). Cependant, l'analyse de la séquence des aminoacides de DAX-1 n'a pas révélé la présence de signaux identifiés comme permettant l'import (NLS) ou l'export (NES) nucléaire. Nous nous sommes donc demandés comment la localisation de DAX-1 est régulée et quels sont les signaux impliqués. Un des premiers objectifs de ma thèse était d'étudier le transport nucléocytoplasmique de DAX-1 et notamment d'identifier les régions impliquées, ainsi que la régulation de ce transport.

DAX-1 agit comme répresseur transcriptionnel, cependant son mécanisme de répression reste obscur. Au début de ma thèse, il avait été montré que quelques corépresseurs interagissaient avec DAX-1 mais la preuve formelle qu'ils agissaient comme corépresseurs de DAX-1 n'avait pas été apportée. De plus, il avait aussi été montré que des mutants de DAX-1 identifiés chez des patients avec AHC avaient perdu leur activité de répression transcriptionnelle. Cependant, nous ne savions pas comment DAX-1 réprime la transcription de gènes cibles. Le second objectif de ma thèse était donc de mieux caractériser le mécanisme de répression de DAX-1.

Les résultats que j'ai obtenus ont fait l'objet de trois articles dont les deux premiers ont été publiés et le dernier a été soumis pour publication. Les articles sont présentés en page 58, 64 et 74, et renferment les résultats majeurs de ma thèse. J'ai aussi présenté quelques résultats complémentaires en page 93. L'ensemble des résultats est résumé et discuté dans la partie discussion et perspectives en page 96.



# Résultats

## Publication 1



*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Sylvia G. Lehmann, Enzo Lalli, and Paolo Sassone-Corsi**

**X-linked adrenal hypoplasia congenita is caused by abnormal nuclear localization of the DAX-1 protein .**

PNAS 99, 8225-8230 (2002)

Pages 8225-8230 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## Publication 2



*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Sylvia G. Lehmann**, Jean-Marie Wurtz, Jean-Paul Renaud, Paolo Sassone-Corsi and Enzo Lalli

**Structure-function analysis reveals the molecular determinants of the impaired biological function of DAX-1 mutants in AHC patients.**

Human Molecular Genetics 12, 1063-1072 (2002)

Pages 1063-1072 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/reprint/12/9/1063.pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## **Publication 3**

### **Heat shock affects trafficking of DAX-1 by inducing its rapid and reversible cytoplasmic localization**

Sylvia G. Lehmann<sup>1</sup>, Paolo Sassone-Corsi<sup>1</sup>, Enzo Lalli<sup>1, 2, 3</sup>

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
Centre National de la Recherche Scientifique  
Université Louis Pasteur  
B.P. 163, 67404 Illkirch, France

2 Present address : Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire  
CNRS UMR 6097 – Université de Nice Sophia Antipolis  
660 route des Lucioles – Sophia Antipolis  
06560 Valbonne, France

3 Corresponding author

DAX-1 is an unusual orphan nuclear receptor whose mutations cause adrenal hypoplasia congenita (AHC) associated with hypogonadotropic hypogonadism (HHG). Subcellular localization of DAX-1 is a critical determinant of its biological activity. Indeed, the missense mutants found in AHC patients have an impaired transcriptional repressor activity due to protein misfolding and shift of their localization to the cytoplasm. For this reason, we set up to identify factors that regulate DAX-1 subcellular localization. Of several stimuli and chemical compounds tested, heat shock was the only stimulus able to induce rapid and massive relocalization of DAX-1 in the cytoplasm. The heat shock effect is reversible and does not involve stimulation of the p38 and ERK pathways. Heat shock probably acts by inducing modifications of DAX-1 and increasing its partitioning in the insoluble cellular fraction.

## Introduction

DAX-1 (NR0B1) (1) is an unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily whose mutations cause the X-linked form of adrenal hypoplasia congenita (AHC), which is constantly associated with hypogonadotropic hypogonadism (HHG) (2,3). DAX-1 expression is restricted to steroidogenic tissues and to some critical sites in the reproductive axis (4). The human *dax-1* gene encodes a 470 amino-acid protein whose carboxyl (C) terminus is similar to the ligand-binding domain (LBD) of nuclear hormone receptors, while its amino (N) terminus is composed of three repeats of 67 to 69 residues with no significant similarity to any other known protein. DAX-1 is a transcriptional repressor of several genes involved in steroid hormone metabolism through a potent transcriptional repression domain present in its C terminus (5-8). All *DAX-1* point mutations identified in patients with AHC alter the protein C terminus and invariably impair its transcriptional repression activity (6,9). Recently we have also shown that the DAX-1 AHC missense mutants are mislocalized in the cytoplasm, probably as a consequence of their misfolded conformation (10,11). DAX-1 localization changes during pituitary development from nucleocytoplasmic at embryonic day (E) 10,5 to nuclear at E 18,5 (12).

Since DAX-1 subcellular localization is a critical determinant of its biological function, it is essential to understand the basis of its regulation. For this reason, we have investigated the implication of different signal transduction pathways and stimulations upon DAX-1 subcellular distribution. We observed that heat shock is the only stimulus affecting DAX-1 localization, working by shifting completely the localization of the DAX-1 protein towards the cytoplasm. DAX-1 heat shock-induced cytoplasmic localization requires the cooperation of the DAX-1 N and C-terminal domains and is reversible. This effect is also independent of Crm1, p38 and ERK. We show here that heat shock acts by inducing modifications of DAX-1 and increasing its insolubility.

## **Materials and methods**

### **DNA clones**

pSV.DAX-1, pSV.DAX-1 R3 (1-205) and pSV.LBD (205-470) expression vectors (10,11) were used for transfection experiments.

### **Cell culture and transfection**

HeLa cells were cultured in DMEM containing 2,5% calf serum, 2,5% FCS and gentamycin. COS-1 cells were cultured in DMEM containing 5% FCS and gentamycin. Human adrenocortical H295R cells were cultured in F12-Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% Nu-Serum (Collaborative Research), 1% ITS Plus (Collaborative Research), 15 mM HEPES, and penicillin-streptomycin. Cells were seeded into six-well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well) and transfected by the calcium phosphate method. For the different stimulations, cells were treated with different inhibitors at the concentrations and times indicated below. For heat shock, the cells, seeded on tissue culture plates were floated in a 45°C water bath for 10 minutes (min). The heat shock treatment did not affect cell viability, as measured by the Trypan blue method.

### **Immunofluorescence**

Immunofluorescence was performed as previously described (10). Briefly, transfected HeLa cells growing in chamber slides (Nunc, France) were fixed 15 min with 4% paraformaldehyde, permeabilized 20 min with 0,1% Triton X-100 in PBS, blocked 30 min with 2% BSA in PBS and incubated overnight with the 2E5 monoclonal antibody, which recognizes an epitope in the DAX-1 N-terminal domain, to detect full-length DAX-1 and its N-terminal domain, or the 3E5 monoclonal antibody to detect the DAX-1 C-ter domain. After washing 20 min with 0,1% Triton X-100 in PBS, the primary antibody was revealed by incubation for 1 hr with an Alexa 594-labelled goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, The Netherlands). DNA was counterstained with Hoechst 33342 dye. Subcellular localization was scored as nuclear when more than 90% of the protein was present in the nucleus. It was scored as cytoplasmic when more than 90% of the protein was

present in the cytoplasm and nucleo-cytoplasmic in all other cases. Data were computed from at least two experiments, which each experiment scoring at least 200 transfected cells.

### **Solubility assays**

For determination of DAX-1 solubility, transiently transfected HeLa cells were scraped and lysed in buffer containing 40mM Hepes pH7,9, 50mM KCl, 1% Triton X-100, 5mM EDTA, 2mM DTT, 1mM PMSF and supplemented with a protease inhibitor cocktail. Supernatant (named as soluble fraction) and pellet (insoluble fraction) fractions were separated by centrifugation at 15000 rpm for 10 min and analysed by SDS-PAGE and Western blot using the 2E5 monoclonal antibody to detect DAX-1.

### ***In vivo* orthophosphate labelling**

Transiently transfected COS-1 cells were incubated in DMEM without orthophosphate for 30 minutes, and thereafter with DMEM containing orthophosphate labelled with <sup>32</sup>P for 3 hours. The cells were submitted or not to heat shock and harvested, lysed in RIPA buffer and immunoprecipitation with the 2E5 antibody was performed. The immunoprecipitates were run on a SDS-PAGE gel and exposed.

### **Two-Dimensional Gel Electrophoresis**

Transiently transfected COS-1 cells were resuspended and lysed 10 min in isoelectric focusing (IEF) buffer (7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 50mM DTT). The cell lysate was cleared by centrifugation at 10,000g for 10 min. Biolytes (pH 3-10) (Biorad) were added to the extract (0,2%) and 200 µg of total proteins were loaded on ReadyStrips (pH 3-10) and allowed to rehydrate during 9 hours (hr). A step gradient of 50-8000 V was applied to the strips followed by constant 8000 V, with focusing complete after 60,000 V-h. The protean IEF cell BioRad apparatus was used for the IEF. The strips were then incubated 20 min in equilibration buffer (6M urea, 0,375M Tris pH 8,8, 2% SDS, 20% glycerol and 2% DTT) and inserted onto a 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with the 2E5 antibody (13) to visualize DAX-1 or with a mouse anti-LDH antibody (Sigma) for the endogenous LDH.

### **Results**

### **Heat shock selectively affects DAX-1 subcellular localization**

The observation that the DAX-1 protein is shuttling between the nucleus and the cytoplasm and that its subcellular localization has three distinct patterns (nuclear, cytoplasmic, and nucleo-cytoplasmic) in transfected cells (10) suggests that DAX-1 subcellular localization may be regulated by signalling pathways or cell cycle progression. To study how different treatments control DAX-1 localization, we expressed DAX-1 in HeLa cells and treated the cells with various stimuli (Fig. 1A). Prior to stimulations, the cells were pretreated with an inhibitor of protein synthesis, cycloheximide (15  $\mu\text{g/ml}$  starting from 30 min before and during all the time of stimulation), to make sure that the observed results are truly due to alterations in the kinetics of cycling between the compartments and not to a cytoplasmic accumulation of newly synthesized DAX-1. Cycloheximide treatment alone does not modify DAX-1 subcellular localization. As we have shown previously (10,11), in untreated cells DAX-1 is predominantly nuclear, but its localization is cytoplasmic or nucleo-cytoplasmic in a subset of cells (about 20%). The distribution of DAX-1 is not modified by treatment with anisomycin (50 ng/ml for 30 min), sorbitol (0,6M for 30 min), UV (500mJ associated or not with a 30 min recovery period), arsenite at a sub-lethal (0,5mM) or a lethal concentration (2 mM for 1 hour), and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$  for 30 min and 1 hour). Conversely, heat shock (10 min at 45°C) completely reverses the subcellular distribution of DAX-1, which becomes mainly cytoplasmic after only 10 min of shock.

The cells were also treated with chemical inhibitors or activators of diverse pathways (Fig. 1B): an inhibitor of the RNA polymerase actinomycin D (5 ng/ml for 3 hours), the PI3 kinase inhibitor wortmannin (10 nM for 3 hours), the PKA activator dibutyryl-cAMP (1mM for 3h), the ERK inhibitor PD 98059 (20  $\mu\text{M}$  for 1 hour), and the p38 inhibitor SB 203580 (20  $\mu\text{M}$  for 1 hour). None of these inhibitors or activators have an effect upon DAX-1 subcellular localization.

We also studied whether DAX-1 subcellular localization is dependent upon cell cycle progression. In order to test this hypothesis, we checked DAX-1 localization immediately after 48h of serum starvation or after serum starvation followed by the addition of serum (2,5%) or EGF (30 ng/ml) for 30 min or 1 hour (Fig. 1C). No change in DAX-1 subcellular localization is observed in all these conditions. We can conclude that DAX-1 subcellular localization is not cell cycle-dependent.

### **Endogenous DAX-1 is also responsive to heat shock**

Considering the striking effect of heat shock on DAX-1 subcellular localization when the protein is transiently expressed in HeLa cells (Fig. 2A), we wanted to corroborate if the endogenous protein also shows the same behaviour. Human adrenocortical H295R cells were used to study the endogenous DAX-1. As previously shown, DAX-1 is localized mainly in the nucleus but also in the cytoplasm in this cell line (14). No staining is observed when using non-specific IgG as primary antibody (data not shown). Incubation of H295R cells at 45°C for 10 min causes a reversion of DAX-1 subcellular distribution (Fig. 2B). Indeed, DAX-1 is localized mainly in the cytoplasm with an intense staining in the perinuclear region and cytoplasmic aggregates are visible in form of small dots. As a control, we also checked the localization of the transcription factor CREB. Its nuclear localization is not changed by heat shock (data not shown).

The magnitude of the heat shock effect upon DAX-1 protein localization is cell type-dependent: in transfected COS cells, the percentage of cells with cytoplasmic localization of DAX-1 after heat shock is higher than in HeLa cells (Fig 2C). In COS cells we observed a heat shock effect which is proportional to the temperature (42°C or 45°C) and the duration (5 or 10 min) of the heat shock.

### **Both isolated DAX-1 N- and C-terminal domains display cytoplasmic localization subsequently to heat shock**

We next wanted to identify the role of the different domains of DAX-1 in the heat shock-induced redistribution of DAX-1. To this purpose, we studied the distribution of the truncated proteins corresponding to the N-terminal (1-205) and the C-terminal (205-470) domains of the DAX-1 protein transiently expressed in HeLa cells, in basal conditions or after heat shock treatment. For both the DAX-1 N-terminal and C-terminal domains, we observe at the basal state 5 to 10% of cells with a cytoplasmic localization (Fig. 3A). After heat shock, this percentage increases up to 50%, while the full-length protein is localized in the cytoplasm of 80% of the cells. These data show that both isolated DAX-1 N- and C-terminal domains are sensitive to heat-

shock induced cytoplasmic redistribution and their effect is additive on the behaviour of the full-length protein.

### **DAX-1 heat shock-induced nuclear exclusion is independent of Crm1, p38 and ERK**

The cytoplasmic localization of DAX-1 observed after heat shock could be due to a blockage of the nuclear import or an increase in the nuclear export. To discriminate between these two hypotheses, we treated the cells with the Crm1 inhibitor leptomycin B (20ng/ml for 8 hours). In transfected HeLa cells, the localization of full-length DAX-1 is not modified by leptomycin B in cells cultured in basal conditions and after heat shock (Fig. 3B). The same results were obtained with the DAX-1 N and C terminal domains (Data not shown). We can conclude that the cytoplasmic localization observed in response to heat shock is not mediated by a Crm1 dependent export.

In addition, heat shock produces activation of the p38 kinase and extracellular signal-regulated kinases (ERKs) (15,16). So we decided to investigate whether these pathways are implicated in the heat-induced relocalization. We exposed transiently transfected HeLa cells to heat shock in the presence of SB 203580, the p38 inhibitor (20  $\mu$ M for 1 hour) or PD 98059, the ERK inhibitor (20  $\mu$ M for 1 hour). These compounds do not alter the intracellular localization of DAX-1 protein in cells cultured at 37°C, nor they affect its redistribution in the cytoplasm consequently to heat shock (Fig. 3B). We performed control experiments to verify that these inhibitors are active and they are able to block specifically the phosphorylation of p38 and ERK after a proper stimulus (Fig. 3C). We can conclude that the effect of heat shock upon DAX-1 localization is not mediated through the p38 and ERK pathways.

### **DAX-1 heat shock-induced nuclear exclusion is reversible**

The heat shock-induced cytoplasmic localization is a dynamic and reversible process. Indeed, if we submit cells to a heat shock and then we allow them to recover for 30 min at 37°C, we observe that DAX-1 is again in the nucleus and has the same distribution as in the basal conditions (Fig. 3D). We then wondered if heat-shock protein 90 (HSP 90) is involved in DAX-1 changes of localization. We decided

to treat the cells with the HSP90 inhibitor geldanamycin and we observe an incomplete recovery of nuclear localization, with 50% of the cells still exhibiting a cytoplasmic localization of DAX-1 30 minutes after recovery at 37°C. Conversely, HSP90 does not play an essential role for the regulation of DAX-1 subcellular localization in basal conditions, since the treatment of cells with geldanamycin does not affect its subcellular localization in cells cultured at 37°C (Figure 3D). This observation is consistent with the absence of interaction observed between DAX-1 and components of the heat shock protein complex in basal conditions (10).

### **Heat shock increases DAX-1 insolubility**

After heat shock, DAX-1 is located mainly in the cytoplasm and more precisely in the perinuclear region, tending to form aggregates (Fig. 2). We then hypothesized that heat shock acts by affecting DAX-1 solubility and leading to the formation of aggregates. We analyse the solubility of the DAX-1 protein in a buffer including detergent before, immediately after, and 30 min after a heat shock at 45°C for 10 min. HeLa cells transiently transfected with DAX-1 were lysed in buffer containing 1% Triton X-100. When cells are not submitted to any treatment, DAX-1 is present mainly in the insoluble fraction, but a small percentage (7%) is soluble (Fig.4). After heat shock, no DAX-1 is found in the soluble fraction. If cells are allowed to recover for 30 min after heat shock, we observe the same distribution as in basal conditions. These data show that heat shock increases the insolubility of DAX-1 and probably leads to aggregation of DAX-1 that is mislocalized in the cytoplasm. This increased insolubility is reversible after recovery at 37°C and this coincides with the return of DAX-1 to the nucleus.

### **Heat shock induces modifications of the DAX-1 protein**

The striking observation that heat shock induces a reversible cytoplasmic localization and an increased insolubility of DAX-1 lead us to hypothesize that heat shock could induce post-translational modifications of DAX-1 which in turn could modify its solubility. We first checked if DAX-1 phosphorylation level was modified by heat shock. To study this possibility, we performed *in vivo* orthophosphate labelling of DAX-1 transfected COS-1 cells by incorporation of orthophosphate labelled with <sup>32</sup>P

to cells cultured in basal conditions or submitted to heat shock and followed by DAX-1 immunoprecipitation. We observed that in basal conditions, DAX-1 is phosphorylated and the level of phosphorylation is slightly increased by heat shock (Fig.5A).

Next, we performed two-dimensional gel electrophoresis of total protein extracts of COS-1 cells transiently transfected with DAX-1 submitted or not to heat shock. With the [Compute pI/Mw](#) tool from the ExPASy web page, we calculated the theoretical pI of DAX-1 that is 8,5. In basal conditions, DAX-1 seems to undergo numerous modifications and be present under different forms of different pI as could be deduced by the presence of numerous dots. We can distinguish two main basic spots A and B that correspond to two major forms, and four smaller spots more acidic than the other two (Fig.5B). After heat shock, we observed a change of the spots profile, with a single main spot named C, which has a pI intermediate between the pIs of the two main forms observed in basal conditions and probably three minor spots more acidic which were not well separated. The endogenous LDH was used as an internal control (asterisk). From these experiments, we can conclude that heat shock induces post-translational modifications of DAX-1 which modify its pI.

## **Discussion**

Nucleocytoplasmic transport constitutes an important aspect of the regulation of fundamental cellular processes, such as gene expression, signal transduction, and cell cycle progression. DAX-1 subcellular localization is modified in AHC and during pituitary development (10,12). It is therefore critical for its function and needs to be tightly controlled. Here we demonstrate that heat shock regulates DAX-1 protein by modifying it, increasing its insolubility and changing its subcellular localization by causing its sequestration in the cytoplasm.

Heat shock induces the phosphorylation and sumoylation of the heat shock factor 1 (HSF1) (17). Our present study indicates that heat shock changes DAX-1 post-translational modifications. As we observed a slight increase in the phosphorylation level after heat shock, we could speculate the heat shock induces phosphorylation.

But the change in the two-dimensional electrophoresis spots profile can not be explained only by phosphorylation. We then speculate that other modifications such as acetylation, glycosylation, methylation, sumoylation, or ubiquitination may occur in response to heat shock. Since no post-translational modifications of DAX-1 have been reported up to today, the characterization of these modifications and their changes by heat shock would be essential for understanding the regulation of DAX-1 function.

Here, we show that heat shock reversibly increases DAX-1 insolubility and leads to the formation of aggregates. This phenomenon is also seen with several proteins like luciferase (18), MKP-1 and 3 ERK phosphatases (16) and M3/6 JNK phosphatase (19). In all these cases and also in the case of DAX-1, heat induced inactivation is reversible under the conditions of heat shock performed. The severity of the heat shock-induced damage is critical for determining the functional restoration of the aggregated protein via some chaperones as the ClpB/Hsp104 and Dna K/HSP 70, or its targeting to proteolysis (20). In the case of DAX-1, the chaperone HSP90 seems to be important for the recovery after heat shock of the nuclear localization and probably the restoration of the aggregates, but other factors may be implicated.

DAX-1 heat shock-induced cytoplasmic localization is reversible and requires the cooperation of the N- and C-terminal domains and is independent of Crm1, p38 and ERK. The heat shock effect on DAX-1 localization is highly specific because other stimulations inducing cellular stress (sorbitol, UV, arsenite, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the activation or inhibition of diverse pathways do not affect it. Heat shock induces a strong stress response and affects the nucleocytoplasmic distributions of a variety of proteins such as importin  $\alpha$ , 70 kD heat shock cognate protein (hsc70) (21), CK2 protein kinase (22). Nevertheless, the effect of heat shock upon importin  $\alpha$  trafficking is not specific, since other cellular stresses produce the same effect (23). Interestingly, another member of the nuclear receptor family, the glucocorticoid receptor behaves differently and in its unliganded state moves to the nucleus after heat shock (24). It would be interesting to test the behaviour of other members of the family in response to heat shock.

It has been shown that heat shock reversibly inhibits the binding of a protein complex from MA10 cells (mouse Leydig tumor cells) to the StAR promoter (25). As DAX-1 binds to StAR promoter (8), and considering the multiple effects of heat shock on DAX-1, we can speculate that consequently to heat shock, the ability of DAX-1 to

bind to protein partners and/or to DNA is impaired. Heat shock alters DAX-1 function by inducing some changes at different levels: post-translational modifications, solubility, localization; the deeper characterisation of which would be of a great interest for a better comprehension of DAX-1 function.

## Acknowledgments

We thank E. Heitz and all the members of the Sassone-Corsi laboratory for help, reagents and discussions, M. Argentini for help with the two-dimensional electrophoresis procedure and the IGBMC cell culture, oligonucleotide synthesis, microscopy and sequencing facilities. S.G.L. was a recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Hospitalier Universitaire Régional, Fondation de la Recherche Médicale, Association pour la Recherche sur le Cancer, Human Frontiers Science Program and Organon (Akzo/Nobel).

## Figure legends

**Figure 1** Subcellular localization of DAX-1 protein in transfected HeLa cells is changed only by heat shock. Percentage of nuclear localization is indicated with black histograms, nucleo-cytoplasmic localization in grey and cytoplasmic localization in white, respectively. At least 200 transfected cells were scored for each experimental condition. (A) Effect of heat shock and other cellular stresses. (B) Effect of chemical compounds and inhibitors. (C) Effect of culture conditions.

**Figure 2** Heat shock effect is cell type-specific (A) HeLa cells growing at 37°C (top) or heat shocked at 45°C for 10 minutes (bottom). Localization of transfected DAX-1 protein is shown in red and nuclear staining in blue. (B) As in (A), but localization of the endogenous DAX-1 protein in H295R cells is shown in red. (C) Histogram showing the differential effect of heat shock upon DAX-1 protein distribution in HeLa vs. COS cells. Percentage of nuclear localization is indicated with black histograms, nucleo-cytoplasmic localization in grey and cytoplasmic localization in white, respectively.

**Figure 3** Effect of drugs upon heat shock effect (A) N- and C-terminal domains of the DAX-1 protein are both sensitive to heat shock. (B) Heat shock effect is not sensitive to nuclear export block by leptomycin B, nor to ERK (PD98059) or p38 (SB203580) block. Efficacy of PD98059 and SB203580 is shown in (C). (D) Heat shock effect is reversible and geldanamycin treatment inhibits partially recovery. In all histograms,

percentage of nuclear localization is indicated with black histograms, nucleocytoplasmic localization in grey and cytoplasmic localization in white, respectively.

**Figure 4** DAX-1 insolubility is reversibly increased after heat shock. Transfected HeLa cells were extracted with a buffer containing detergent, as described in Materials and Methods, and presence of the DAX-1 protein in soluble (S) and insoluble (I) fractions was assessed by Western blot. Quantification of the results is shown in the histogram.

**Figure 5** DAX-1 is modified after heat shock. (A) DAX-1 phosphorylation level slightly increases following heat shock. Transfected COS cells were labelled *in vivo* with <sup>32</sup>P-orthophosphate and DAX-1 was subsequently immunoprecipitated in stringent conditions. (B) 2D gel electrophoresis of protein extracts from transfected COS cells growing at 37°C (top) or heat shocked at 45°C for 10 minutes (bottom), showing modifications of the DAX-1 protein, which are changed subsequently to heat shock. The endogenous LDH was used as an internal control (asterisk).

## References

1. Committee, N. R. N. (1999) *Cell* **97**, 161-163
2. Muscatelli, F., Strom, T. M., Walker, A. P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., and Rabl, W. (1994) *Nature* **372**, 672-676
3. Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., and McCabe, E. R. (1994) *Nature* **372**, 635-641
4. Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T. J., Hentges, K. E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K. T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G., and Parker, K. L. (1996) *Mol Endocrinol* **10**, 1261-1272
5. Ito, M., Yu, R., and Jameson, J. L. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 1476-1483
6. Lalli, E., Bardoni, B., Zazopoulos, E., Wurtz, J. M., Strom, T. M., Moras, D., and Sassone-Corsi, P. (1997) *Mol Endocrinol* **11**, 1950-1960
7. Lalli, E., Melner, M. H., Stocco, D. M., and Sassone-Corsi, P. (1998) *Endocrinology* **139**, 4237-4243
8. Zazopoulos, E., Lalli, E., Stocco, D. M., and Sassone-Corsi, P. (1997) *Nature* **390**, 311-315
9. Zhang, Y. H., Guo, W., Wagner, R. L., Huang, B. L., McCabe, L., Vilain, E., Burris, T. P., Anyane-Yeboah, K., Burghes, A. H., Chitayat, D., Chudley, A. E., Genel, M., Gertner, J. M., Klingensmith, G. J., Levine, S. N., Nakamoto, J., New, M. I., Pagon, R. A., Pappas, J. G., Quigley, C. A., Rosenthal, I. M., Baxter, J. D., Fletterick, R. J., and McCabe, E. R. (1998) *Am J Hum Genet* **62**, 855-864
10. Lehmann, S. G., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8225-8230
11. Lehmann, S. G., Wurtz, J. M., Renaud, J. P., Sassone-Corsi, P., and Lalli, E. (2003) *Hum Mol Genet* **12**, 1063-1072
12. Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, M., and Morohashi, K. (2003) *Mol Endocrinol* **17**, 994-1004
13. Tamai, K. T., Monaco, L., Alastalo, T. P., Lalli, E., Parvinen, M., and Sassone-Corsi, P. (1996) *Mol Endocrinol* **10**, 1561-1569

14. Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C., and Sassone-Corsi, P. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 4910-4921
15. Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002) *Science* **298**, 1911-1912
16. Yaglom, J., O'Callaghan-Sunol, C., Gabai, V., and Sherman, M. Y. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 3813-3824
17. Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 2953-2968
18. Michels, A. A., Nguyen, V. T., Konings, A. W., Kampinga, H. H., and Bensaude, O. (1995) *Eur J Biochem* **234**, 382-389
19. Palacios, C., Collins, M. K., and Perkins, G. R. (2001) *Curr Biol* **11**, 1439-1443
20. Lee, S., Sowa, M. E., Choi, J. M., and Tsai, F. T. (2004) *J Struct Biol* **146**, 99-105
21. Furuta, M., Kose, S., Koike, M., Shimi, T., Hiraoka, Y., Yoneda, Y., Haraguchi, T., and Imamoto, N. (2004) *Genes Cells* **9**, 429-441
22. Gerber, D. A., Souquere-Besse, S., Puvion, F., Dubois, M. F., Bensaude, O., and Cochet, C. (2000) *J Biol Chem* **275**, 23919-23926
23. Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., and Yoneda, Y. (2004) *J Cell Biol* **165**, 617-623
24. Sanchez, E. R. (1992) *J Biol Chem* **267**, 17-20
25. Murphy, B. D., Lalli, E., Walsh, L. P., Liu, Z., Soh, J., Stocco, D. M., and Sassone-Corsi, P. (2001) *Mol Endocrinol* **15**, 1255-1263

**Figure 1**

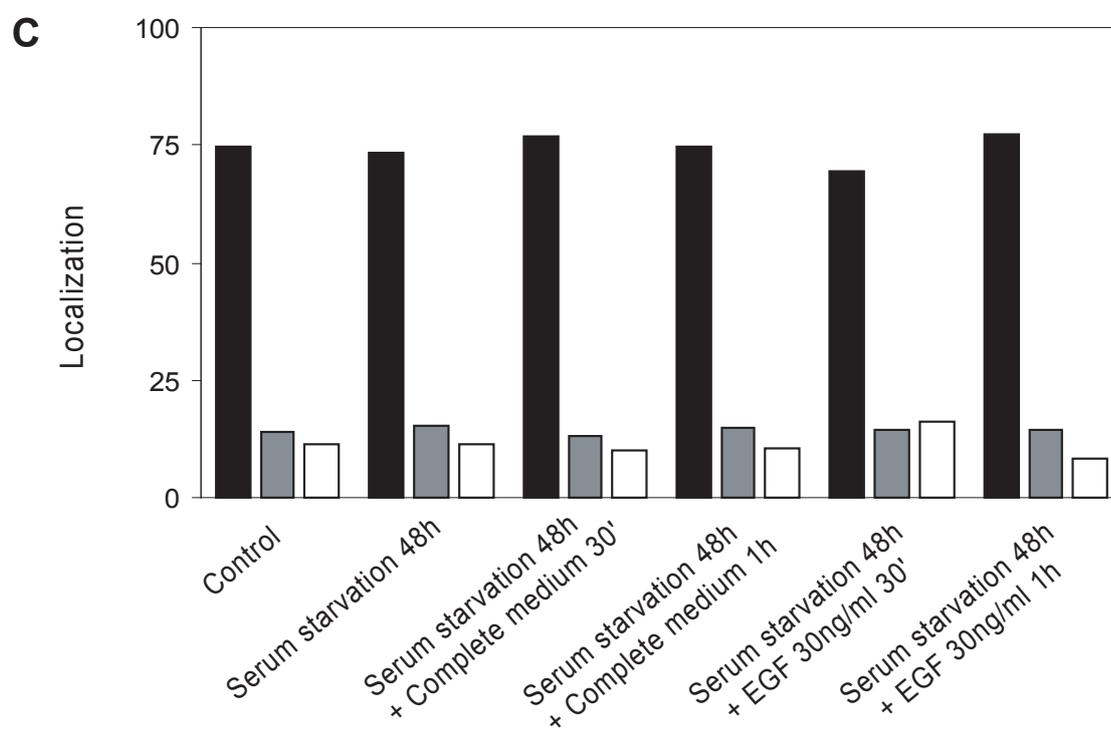
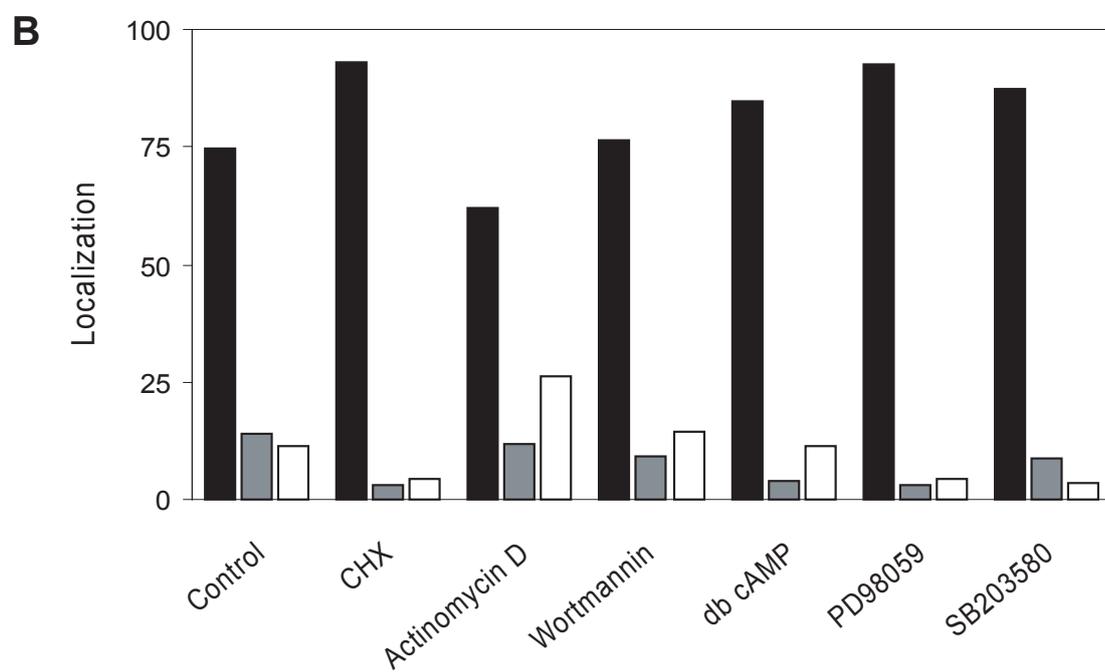
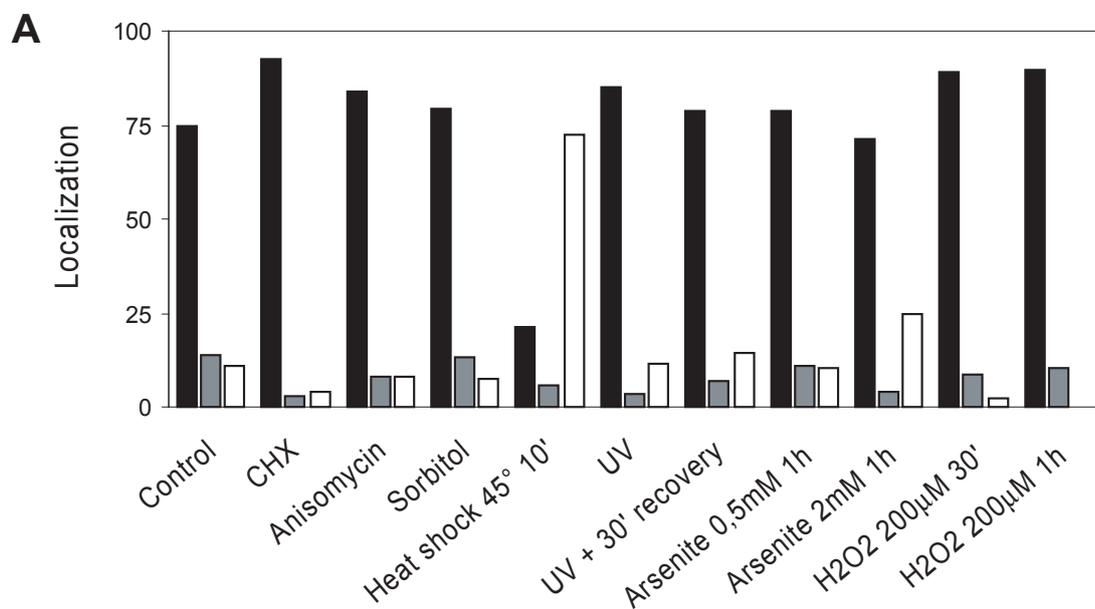
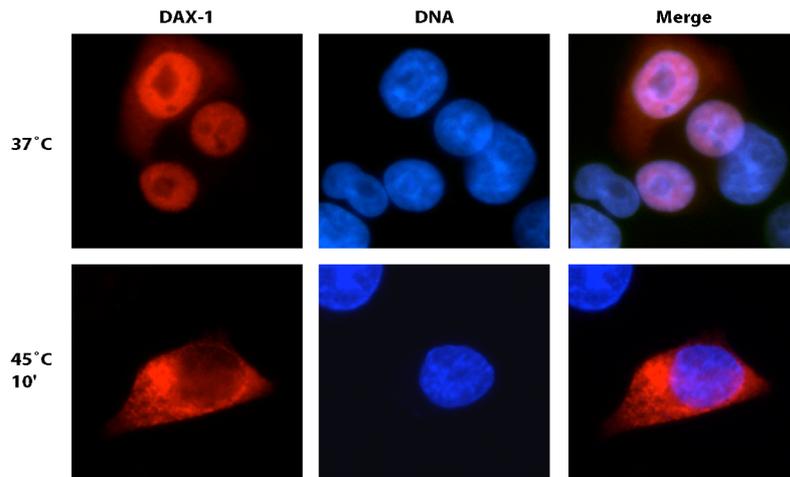
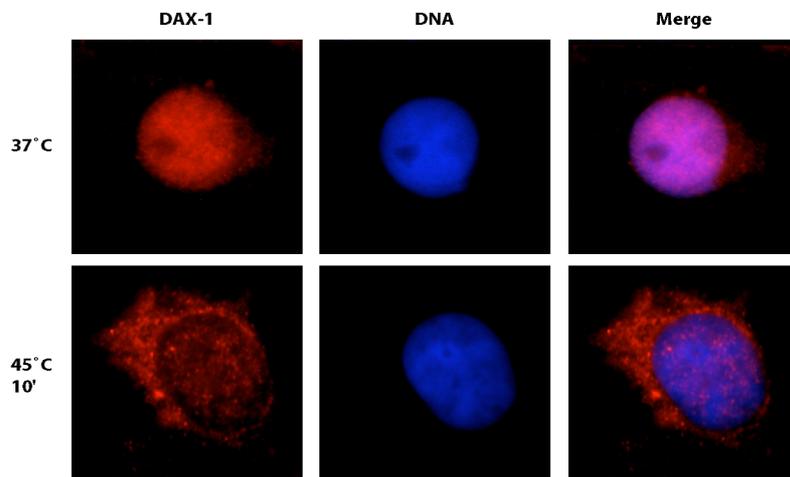


Figure 2

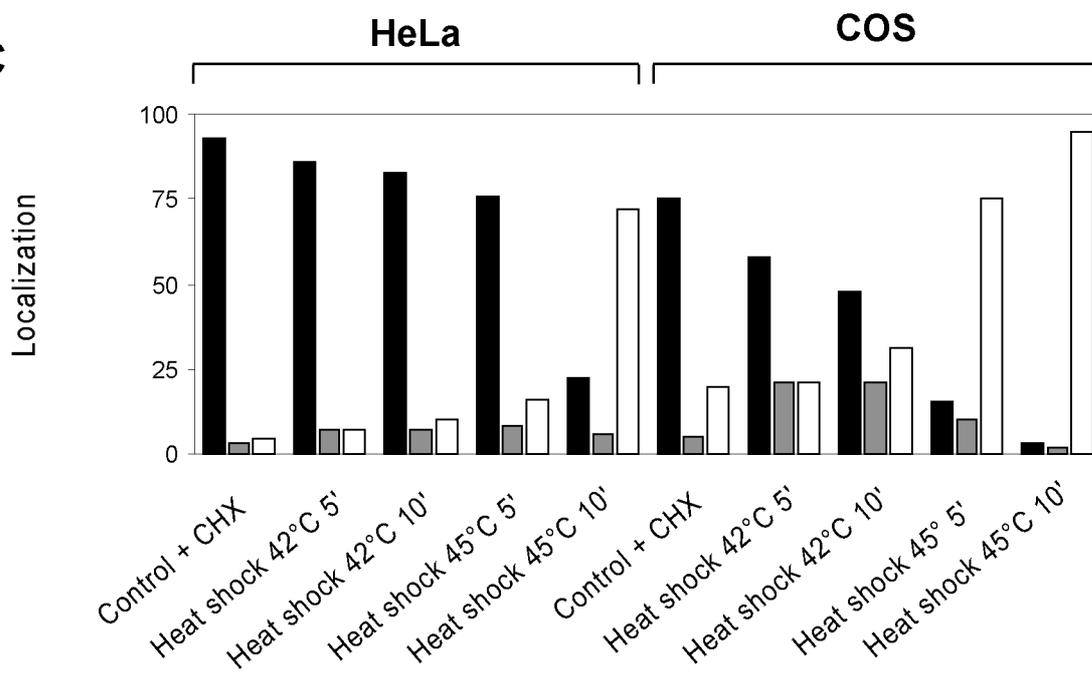
**A**



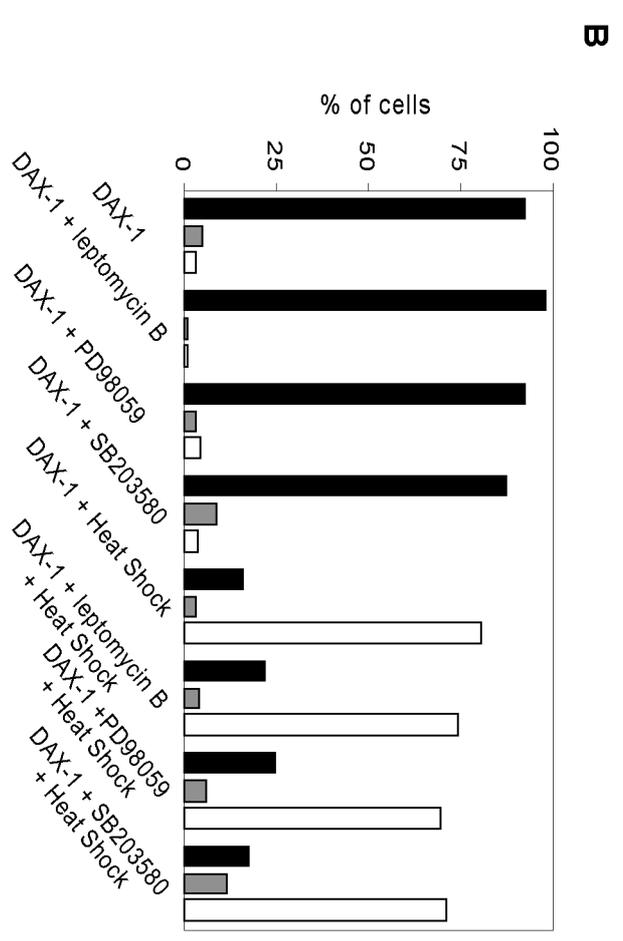
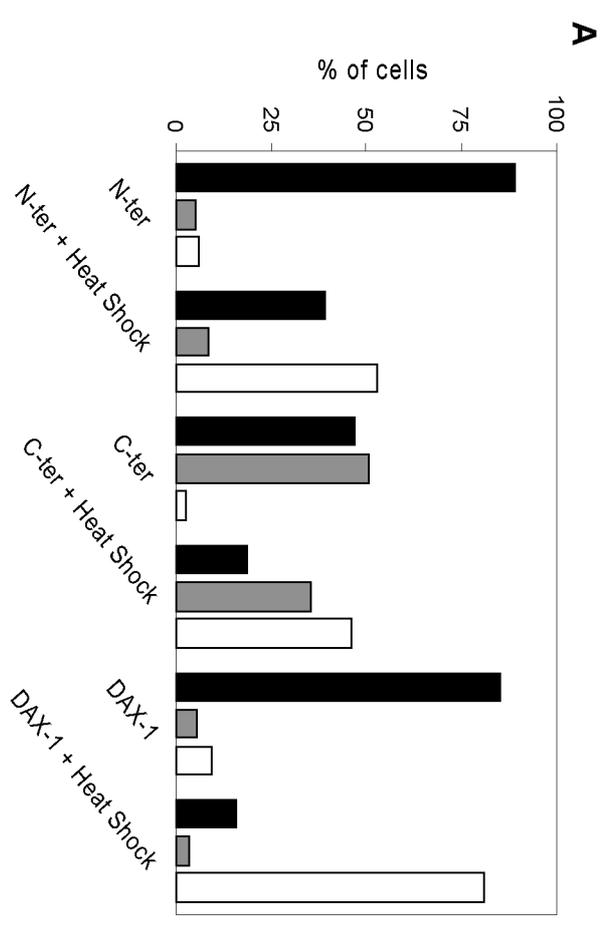
**B**



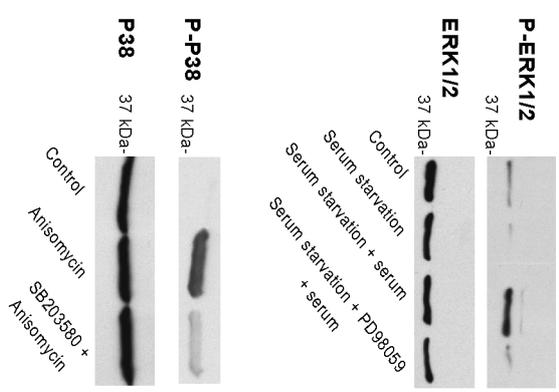
**C**



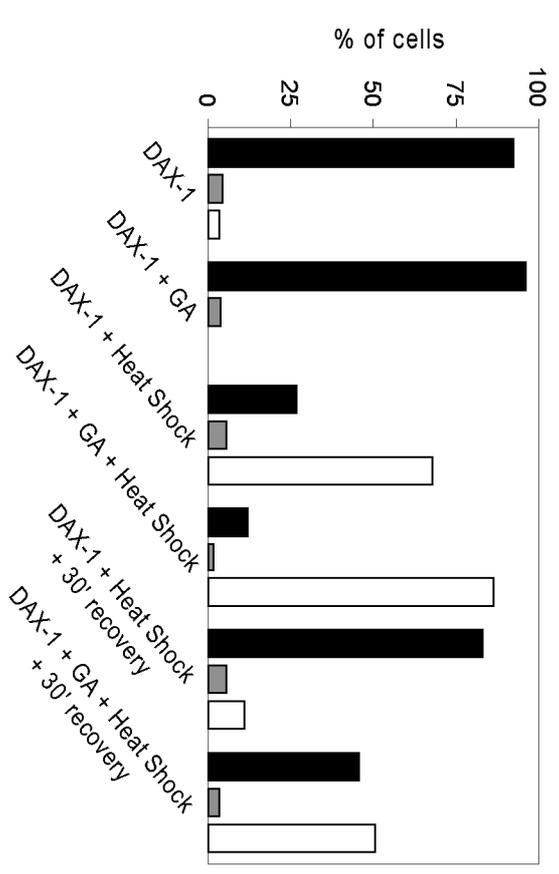
**Figure 3**



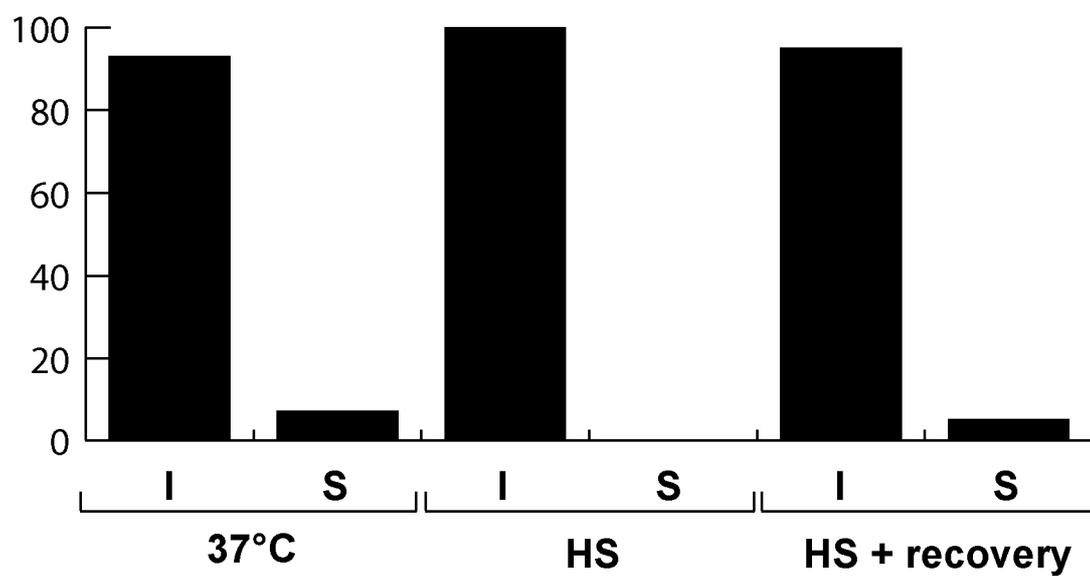
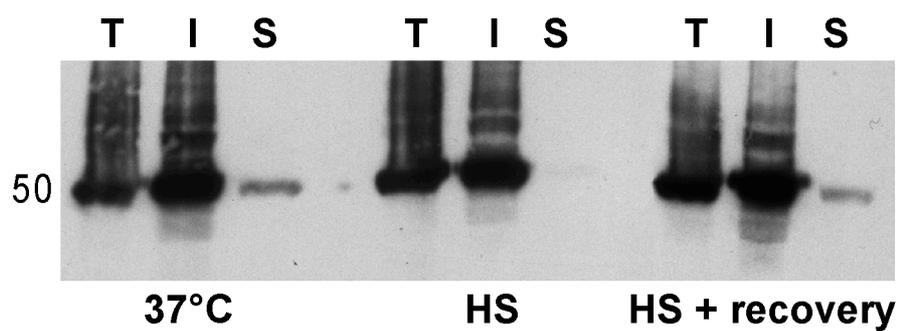
**C**



**D**

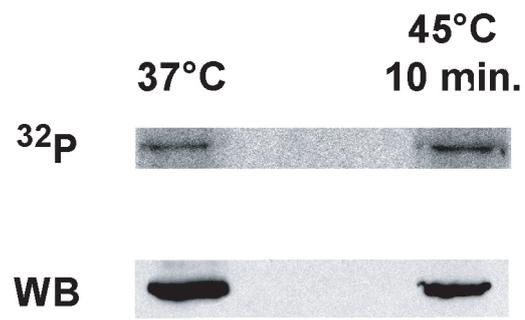


**Figure 4**

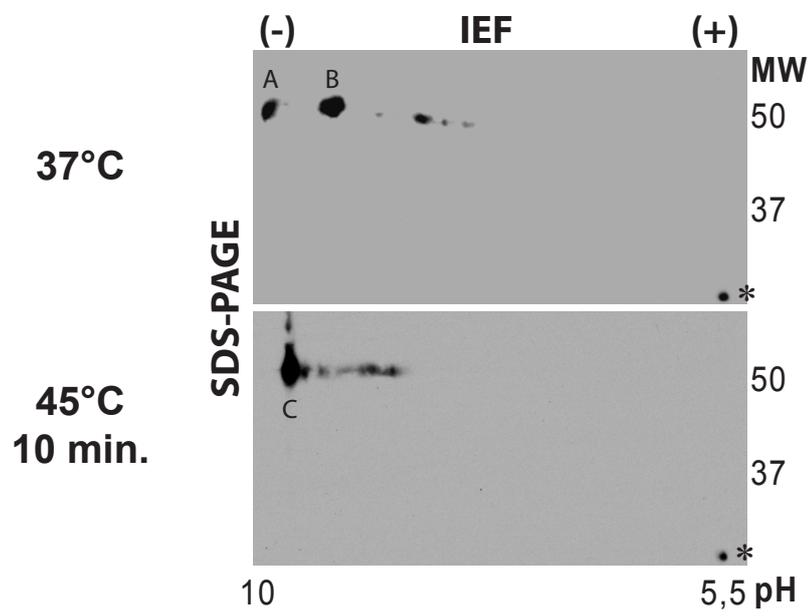


**Figure 5**

**A**



**B**

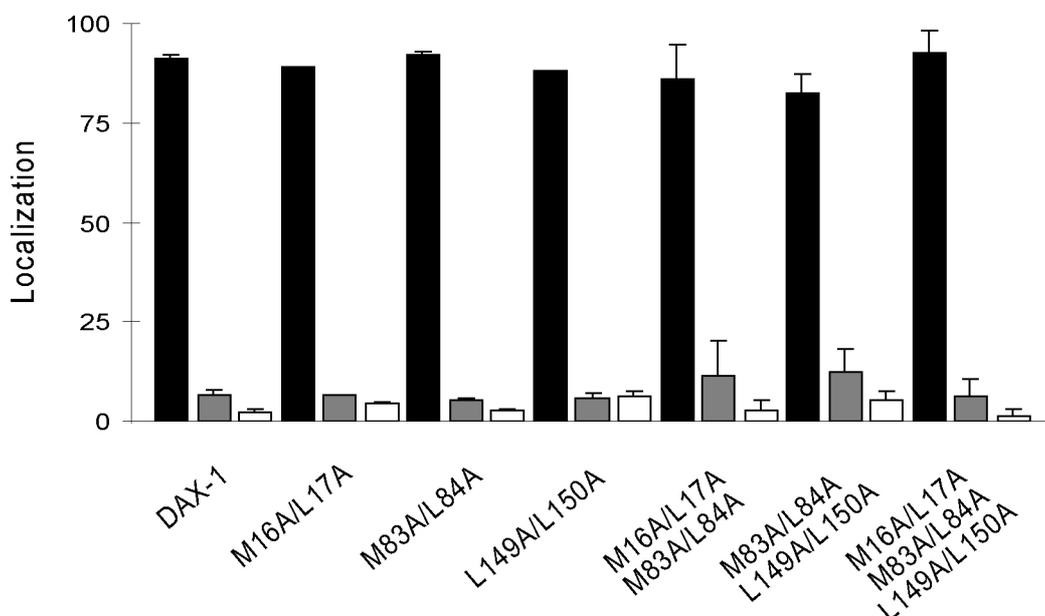




## Résultats complémentaires

### **1. Effet des mutations des « motifs LxxLL » du domaine N-terminal de DAX-1 sur sa localisation intracellulaire**

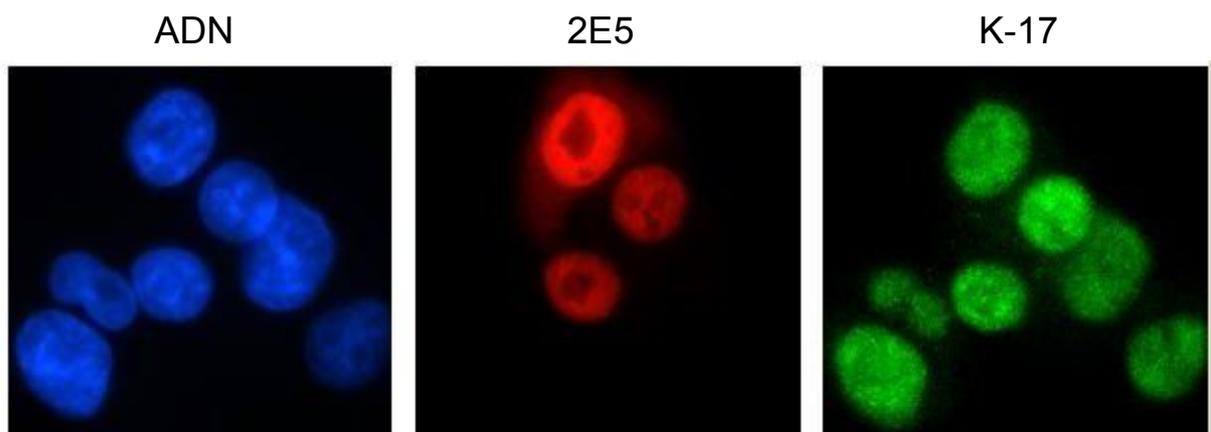
Dans chaque répétition du domaine N-terminal de DAX-1, la présence d'un motif riche en leucines qui ressemble aux motifs LxxLL (ou NR box) des coactivateurs a été suggérée. Une étude a montré que ces « motifs » étaient importants pour la localisation nucléaire de DAX-1 en présence de SF-1 (Kawajiri et al., 2003). J'ai donc introduit par mutagenèse dirigée des mutations de chaque motif (DAX-1 M16A/L17A, M83A/L84A, et L149A/L150A), de deux motifs (M16A/L17A/M83A/L84A et M83A/L84A/ L149A/L150A), et des trois motifs simultanément (M16A/L17A/M83A/L84A/L149A/L150A). J'ai ensuite observé la localisation intracellulaire de ces mutants en utilisant les mêmes conditions que dans les publications 1 et 2. Comme, on peut le constater sur la figure 16, les simples, doubles et triple mutations n'ont pas d'effet sur la localisation intracellulaire de DAX-1 qui est toujours nucléaire et ceci même en absence de SF-1 dans cette expérience utilisant des cellules HeLa qui n'expriment pas SF-1.



**Figure 16 :** Effet des mutations des « motifs LxxLL » du domaine N-terminal de DAX-1 sur sa localisation intracellulaire. Le pourcentage de cellules où la protéine est nucléaire est représenté en noir, où elle est nucléo-cytoplasmique en gris et cytoplasmique en blanc.

## 2. Test de l'anticorps K-17

Dans le laboratoire, nous disposons de deux anticorps monoclonaux de souris produits dans l'institut qui sont capables de reconnaître spécifiquement DAX-1. Ce sont les anticorps : 2E5 qui reconnaît un épitope (résidus 135-166) dans le domaine N-terminal (Tamai et al., 1996) et le 3E5 qui reconnaît un épitope dans la partie C-terminale (résidus 311 à 340). Ces anticorps ont été testés et sont spécifiques pour DAX-1. Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre DAX-1 est produit par Santa Cruz Biotechnology [catalogue # sc-841 (K-17)]. Nous avons voulu tester cet anticorps pour savoir si nous pouvions l'utiliser. Dans le catalogue, un western-blot montre plusieurs lignées cellulaires positives pour DAX-1 dont des cellules HeLa, or c'est une lignée de cellules de carcinome utérin humain qui n'expriment pas DAX-1. De plus, le poids moléculaire de la bande est plus élevé que celui de DAX-1, j'ai donc décidé de tester cet anticorps. J'ai réalisé une double immunofluorescence en utilisant les anticorps 2E5 et K-17 et des cellules HeLa transfectées avec le vecteur d'expression pour DAX-1 (pSV.DAX-1) en utilisant la méthode de phosphate de calcium. Avec l'anticorps 2E5, on observe un signal majoritairement nucléaire dans quelques cellules (Figure 17). Par contre avec l'anticorps K-17, utilisé à la concentration recommandée par le fabricant, on observe un signal nucléaire dans toutes les cellules. Ce qui est impossible car DAX-1 a été transfecté dans ces cellules et n'est pas exprimé endogènement. Il semble donc que cet anticorps réagisse avec une autre protéine nucléaire.



**Figure 17 :** Double immunofluorescence avec les anticorps 2E5 ou K-17 de cellules HeLa transfectées avec DAX-1. L'ADN est visualisé avec du Hoechst 33342.

Ces résultats m'ont amené à exclure de mon introduction les résultats de localisation de DAX-1 montrés seulement par des méthodes (immunohistochimie ou immunofluorescence) utilisant l'anticorps K-17 et non confirmés par d'autres moyens. Notamment, j'ai exclu les études montrant par immunohistochimie avec cet anticorps l'expression de DAX-1 dans les tissus suivants : la prostate humaine (Agoulnik et al., 2003), l'ovaire humain (Sato et al., 2003), et l'endomètre humain (muqueuse utérine) (Gurates et al., 2002). J'ai cité l'expression de DAX-1 dans la peau humaine car elle a été confirmée par RT-PCR (Patel et al., 2001).



# Discussion et perspectives

## Discussion et perspectives

### **1. Localisation intracellulaire de DAX-1**

La régulation de la localisation intracellulaire des protéines constitue un contrôle supplémentaire de leur fonction. Un des objectifs de ma thèse était de mieux comprendre la distribution intracellulaire de DAX-1 ainsi que sa régulation. J'ai observé la localisation de DAX-1 qui s'est avérée être nucléaire dans la majorité des cellules, mais aussi cytoplasmique et nucléo-cytoplasmique dans quelques cellules (environ 20% des cas - Figure 1 publication 1- Lehmann et al., 2002). Ces résultats sont semblables à ceux observés précédemment dans le laboratoire (Lalli et al., 2000). D'autres équipes ont aussi étudié la localisation intracellulaire de DAX-1 et certaines ont obtenu des résultats un peu divergents. Une étude présente DAX-1 nucléo-cytoplasmique dans des cellules HeLa (Kawajiri et al., 2003). Une autre, utilisant des cellules Cos et l'anticorps commercial K-17, décrit DAX-1 majoritairement cytoplasmique dans 80% des cellules, nucléaire dans 10% des cas et nucléo-cytoplasmique dans les 10% restants (Holter et al., 2002). Finalement, dans des cellules KGN, DAX-1 fusionné à la GFP est observé majoritairement dans le noyau et aussi un peu dans le cytoplasme (Fan et al., 2004). DAX-1 est localisé dans le noyau et dans le cytoplasme et est constamment en mouvement entre les deux compartiments (Lalli et al., 2000). Sa localisation observée à un moment donné est la photographie d'un équilibre qui peut être perturbé par de nombreux facteurs, ce qui pourrait expliquer ces différents résultats. Dans le cytoplasme, DAX-1 est lié à l'ARNm et associé aux polyribosomes (Lalli et al., 2000). Ces observations ont permis de postuler un rôle de DAX-1 dans le transport d'ARN, cependant le rôle cytoplasmique de DAX-1 reste encore méconnu et mérite d'être plus étudié.

La localisation intracellulaire des protéines dépend principalement de la présence ou non de signaux NLS ou NES (voir chapitre 2.4.1 de l'introduction). L'étude de la séquence primaire de DAX-1 n'a pas révélé de NLS ou NES connus. Nous nous sommes donc demandés quelles régions ou séquences déterminaient la localisation intracellulaire de DAX-1. J'ai donc observé la localisation des différentes régions de DAX-1 dans le but d'identifier des séquences importantes pour sa distribution. J'ai constaté que les répétitions dans le domaine amino-terminal agissaient de façon coopérative pour déterminer la localisation majoritairement nucléaire de DAX-1 et que le domaine carboxy-terminal était majoritairement nucléo-cytoplasmique (Figure 1 publication 1). DAX-1 ne possède pas de NLS ou NES connus, cependant DAX-1 est capable d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme

(Lalli et al., 2000) et une séquence dans les répétitions N-terminales permet, lorsqu'elle est répétée, l'import nucléaire. Cependant, quelle est cette séquence ? Est-ce un NLS encore non caractérisé empruntant une nouvelle voie d'import ou permet-elle l'interaction avec un partenaire qui va transporter DAX-1 dans le noyau ?

Dans chaque répétition du domaine N-terminal de DAX-1, la présence d'un motif riche en leucines qui ressemble aux motifs LxxLL ou NR box des coactivateurs a été identifiée. Une étude a montré que ces « motifs » étaient importants pour la localisation nucléaire de DAX-1 en présence de SF-1 (Kawajiri et al., 2003). Cependant, les résultats que j'ai obtenus (Figure 16 résultats complémentaires), montrent que les mutations de ces motifs n'ont pas d'effet sur la localisation intracellulaire de DAX-1 qui est toujours nucléaire et ceci même en absence de SF-1. D'autres séquences du domaine N-terminal semblent donc impliquées dans la localisation nucléaire de DAX-1. Des études de délétion et mutation seraient nécessaires pour définir ce ou ces « NLS ». De plus, il serait intéressant de voir si les domaines N et C-terminaux possèdent la capacité d'effectuer la navette noyau-cytoplasme en effectuant des expériences d'hétérokaryons ou de micro-injection des protéines dans un compartiment et suivre leur localisation. Enfin, des expériences de co-immunoprécipitation à grande échelle pourraient permettre d'identifier les partenaires de DAX-1 et parmi eux sont qui sont responsables de son transport.

J'ai ensuite constaté que la délétion des 4 résidus carboxy-terminaux affectait la localisation de DAX-1 et que des délétions supplémentaires (9 résidus) entraînaient une localisation majoritairement cytoplasmique (Figure 2 publication 1). Ces résultats suggèrent un rôle important de l'hélice H12 dans la localisation de DAX-1. L'identification de partenaires interagissant avec cette hélice, de même que la résolution de la structure cristalline de DAX-1 qui permettrait de connaître le positionnement de H12, pourraient apporter une explication à cette observation.

De plus, j'ai constaté que toutes les mutations ponctuelles identifiées chez des patients avec AHC provoquaient une réversion totale de la distribution intracellulaire de DAX-1, les mutants étant localisés majoritairement dans le cytoplasme (Figure 3 publication 1). Ce changement de localisation des mutants a été aussi observé dans un contexte hétérologue en présence d'un autre NLS (lorsque le domaine carboxy-terminal de DAX-1 est fusionné au domaine de liaison de l'ADN de GAL4 qui possède son propre NLS) (Figure 4 publication 1). J'ai ensuite réalisé une série de mutants pour mieux caractériser l'effet des mutations AHC. J'ai constaté que la substitution des résidus affectés par les mutations AHC par des résidus de

nature chimique similaire n'a pas d'effet sur la localisation et l'activité de répression de la protéine (Figure 3 publication 2-Lehmann et al., 2003). Par contre, plus le changement de la nature et de la taille du résidu est important (par exemple un résidu hydrophobe en résidu polaire), plus la perte de fonction induite est dramatique. J'ai par ailleurs constaté que les mutants AHC de la protéine sont plus sensibles à la digestion limitée à la trypsine ce qui suppose que leur repliement est affecté (Figure 1 publication 2). Ces résultats m'ont amené à conclure que les mutations AHC induisent un mauvais repliement de DAX-1 qui n'est plus localisée majoritairement dans le noyau et qui ne réprime plus l'expression de gènes cibles. En effet, les mutations ponctuelles AHC affectent des résidus prédits importants pour stabiliser le cœur hydrophobe du domaine C-terminal. La localisation cytoplasmique observée des mutants AHC peut résulter d'un blocage de l'import, d'une activation de l'export, d'une séquestration dans le cytoplasme ou d'une perte d'interaction avec un facteur nucléaire. Réaliser des expériences de co-immunoprécipitation à grande échelle, afin d'identifier les différents partenaires de DAX-1 sauvage et mutants, permettrait de savoir quelle hypothèse est vraie.

L'observation de la localisation hétérogène de DAX-1 et de sa modification par les mutations AHC et au cours du développement de l'hypophyse chez la souris (Kawajiri et al., 2003) suggère que la régulation de la localisation de DAX-1 est cruciale pour moduler sa fonction. J'ai donc testé l'implication de différentes voies de signalisation, de différents stress et du cycle cellulaire dans la régulation de la localisation intracellulaire de DAX-1. J'ai constaté que la localisation de DAX-1 est indépendante du cycle cellulaire et n'est pas modifiée par des inhibiteurs ou activateurs de diverses voies de signalisation telles que : protéine kinase A (PKA), kinase PI3 (phosphatidyl inositol tri-phosphate), ERK (extracellular signal regulated kinase) et p38 (Figure 1 publication 3). J'ai aussi soumis les cellules à différentes stimulations ou stress et j'ai constaté que la localisation de DAX-1 est spécifiquement régulée par le choc thermique (Figure 1 publication 3). Ainsi après seulement 10 minutes d'un choc thermique à 45°C, DAX-1 est localisé majoritairement dans le cytoplasme et tend à former des agrégats (Figure 2 publication 3). Cette localisation cytoplasmique de DAX-1 induite par le choc thermique est indépendante de Crm1, p38 et ERK (Figure 3 publication 3). Le choc thermique affecte aussi la solubilité de DAX-1 qui est diminuée et entraîne des modifications de la protéine (Figures 4 et 5 publication 3). De plus, cet effet est réversible car si les cellules récupèrent 30 minutes à 37°C, DAX-1 est à nouveau localisé majoritairement dans le noyau et sa solubilité est identique à celle observée en conditions basales. A ce jour, aucune modification post-traductionnelle de DAX-1 n'a été

reportée. Les résultats obtenus montrent qu'en conditions basales DAX-1 est phosphorylé et qu'il subit probablement d'autres modifications. Ce résultat n'est pas surprenant, car des modifications post-traductionnelles de nombreux facteurs de transcription et récepteurs nucléaires ont été reportées et peuvent moduler leur activité. Le changement de profil des points obtenu par électrophorèse bi-dimensionnelle après choc thermique ne peut pas s'expliquer seulement par une ou plusieurs phosphorylations et semble impliquer d'autres modifications de DAX-1. Des expériences d'immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse permettraient l'identification de ces modifications. Ensuite, l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes effectuant ces modifications, ou de mutants de DAX-1 où les sites cibles de ces enzymes seraient mutés seront nécessaires pour une caractérisation fonctionnelle de ces modifications.

SF-1 et DAX-1 jouent des rôles antagonistes, importants pour la formation et la fonction de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades-surrénales. Leur interaction a été reportée *in vitro* et ne semble pas altérée par une mutation AHC (Ito et al., 1997). Considérant l'effet surprenant des mutations AHC sur la localisation de DAX-1, il était envisageable que les mutants de DAX-1 pourraient délocaliser SF-1. J'ai donc observée la localisation de SF-1 en présence de DAX-1 sauvage et mutant. La localisation nucléaire de SF-1 n'est pas altérée par la co-expression avec des mutants AHC de DAX-1 qui sont délocalisés dans le cytoplasme même en présence de SF-1 (Figure 6 publication 1). L'absence de formation de glandes surrénales fonctionnelles observée dans l'AHC n'est donc pas provoquée par une délocalisation de SF-1.

## **2. Activité de répression de DAX-1**

Les corépresseurs Alien, N-CoR et RIP 140 interagissent avec DAX-1, mais cette interaction n'a été montrée seulement *in vitro*, et à ce jour, il n'y a pas de preuve directe et formelle qu'ils agissent comme corépresseur de DAX-1 (voir chapitre 3.9.4). J'ai testé l'interaction *in vitro* du co-répresseur N-CoR (Nuclear receptor Corepressor) avec DAX-1 sauvage et mutants AHC par « GST-pull down ». L'interaction entre DAX-1 et N-CoR est faible et n'est pas modifiée par les mutations (Figure 5 publication 1). Ces résultats nous poussent à penser que N-CoR ne semble pas être impliqué dans la répression de DAX-1. Il faudrait réaliser d'autres expériences avec Alien et RIP140 afin de savoir s'ils interviennent dans la répression par DAX-1. Par exemple, voir si la co-transfection de ces corépresseurs

peut augmenter l'activité de répression de DAX-1, ou encore inactiver l'expression de ces corépresseurs et voir si DAX-1 conserve son activité de répression.

Les récepteurs nucléaires, afin de réguler la transcription de gènes cibles recrutent des co-facteurs (voir chapitre 2.3 de l'introduction). La surface du LBD responsable de l'interaction avec ces cofacteurs a été définie. Afin de mieux caractériser le mécanisme de répression de DAX-1, j'ai réalisé la mutation des résidus prédits exposés à la surface et correspondants chez les autres membres de la famille aux résidus constituant la surface d'interaction avec des co-répresseurs. J'ai ensuite observé la localisation intracellulaire, l'activité de répression et le taux d'expression de ces mutants de DAX-1 (Figures 2, 5 et 6 publication 2). Ces mutations n'affectent pas la localisation intracellulaire et seulement certaines d'entre elles diminuent l'activité de répression de DAX-1. Cependant dans le cas de ces dernières qui provoquent une baisse d'activité de répression relative (maximum 50%), elles diminuent aussi le niveau d'expression. Ces résultats permettent de suggérer que la surface impliquée, et très certainement le mécanisme de répression de DAX-1 sont différents des autres membres de la famille. L'hélice H12, qui est importante chez les autres récepteurs nucléaires pour la transactivation et l'interaction avec des coactivateurs est conservée chez DAX-1. Cette hélice n'est généralement pas requise pour l'interaction avec des corépresseurs et semble même l'entraver. Seul le récepteur nucléaire orphelin ROR $\alpha$  semble fonctionner différemment et son hélice H12 est importante pour l'interaction avec le corépresseur Hr (Moraitis et al., 2002). Dans le cas de DAX-1, l'hélice H12 est cruciale pour sa localisation, mais aussi pour son activité de répression, comme le montre l'effet de sa troncation ou d'une mutation AHC (L466R). Cette hélice est donc capitale pour la fonction de DAX-1. On peut donc suggérer qu'elle est importante pour maintenir la structure de la protéine, qu'elle permet l'interaction avec un ou plusieurs partenaires ou peut-être avec le domaine N-terminal permettant une communication entre les deux domaines. L'identification des interacteurs d'H12 et de son positionnement serait cruciale pour comprendre sa fonction.

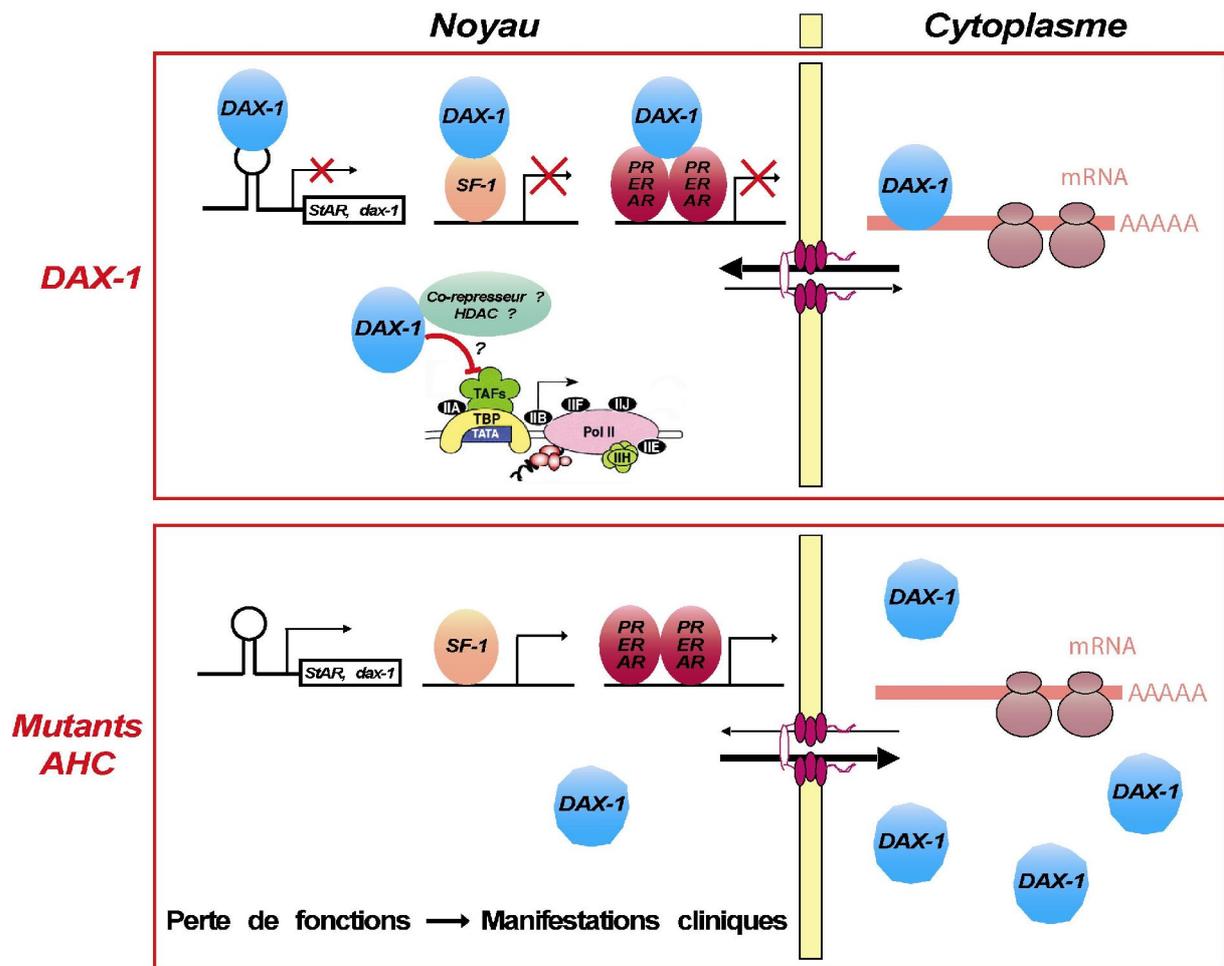
Un co-répresseur de DAX-1 n'a donc pas été identifié de façon formelle à ce jour. Hr, qui interagit avec l'hélice H12 de ROR $\alpha$  pourrait être un candidat, vu le rôle important de l'hélice H12 de DAX-1 pour sa fonction de répression. Nous pouvons donc penser que DAX-1 recrute un (ou plusieurs) co-répresseur encore non identifié. Peut-être qu'il s'agit d'un ARN corépresseur, car on connaît déjà un ARN coactivateur (Lanz et al., 1999) et DAX-1 peut interagir avec l'ARN (Lalli et al., 2000). DAX-1 possède une activité de répression intrinsèque qui fonctionne dans un contexte hétérologue, et son activité de répression a été

observée dans différents types cellulaires et non seulement stéroïdogènes. Ce qui suggère, qu'il est capable de recruter des protéines ubiquitaires. Cependant, dans les tissus où il est spécifiquement exprimé, il est probable qu'il possède des interacteurs spécifiques qui modulent plus finement son activité. Il est aussi possible que DAX-1 puisse agir indépendamment de corépresseur et qu'il interagisse directement avec une protéine modifiant les histones telle qu'une histone déacétylase ou aussi qu'il interfère avec l'activité des facteurs de transcription généraux et empêche la formation d'un complexe de préinitiation actif. En effet, ce type d'interférence a été décrit dans le cas de TR $\beta$  qui en absence de ligand est capable d'interagir avec TFIIB (Transcription Factor IIB) et semble interférer avec la formation du complexe de préinitiation (Tong et al., 1995).

### **3. Considérations et perspectives générales**

Depuis dix ans que le gène *DAX-1* a été identifié, des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension des fonctions de DAX-1 et de son rôle pour le développement et la fonction de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades-surrénales. La figure 18 représente le modèle du fonctionnement normal de DAX-1 et de son altération dans le cas de l'AHC tel que je peux supposer d'après la synthèse des connaissances actuelles et de mes résultats.

Malgré toutes ces avancées, il reste de nombreux points à élucider afin d'acquérir une meilleure compréhension des rôles de DAX-1 et de sa perte de fonction observée dans l'AHC. Tout d'abord, la définition des voies de transduction du signal *in vivo* dans lesquelles la fonction de DAX-1 est importante. Ensuite, l'identification des partenaires (protéines et ARN) interagissant avec DAX-1 et de tous les gènes cibles de DAX-1. Et enfin, la résolution de sa structure cristalline qui permettrait en identifiant ou non un ligand de savoir si DAX-1 est un vrai orphelin ou si son activité est régulée par un ligand. De plus, elle permettrait de déterminer la position des différentes hélices et d'éclaircir le mode d'interaction et de répression de DAX-1. La résolution de la structure du domaine N-terminal constituerait une avancée considérable, la fonction de ce domaine étant peu comprise et le manque d'homologie ne permettant pas d'extrapoler sur sa fonction.



**Figure 18 : Modèle présentant les fonctions de DAX-1 et leur altération dans l'AHC.** Dans le cas de la protéine DAX-1 sauvage (partie supérieure), DAX-1 est localisé majoritairement dans le noyau où il réprime la transcription de gènes cibles *via* différents mécanismes. Notamment, DAX-1 se lie à des structures en épingle à cheveux de promoteurs cibles ou interagit avec d'autres récepteurs nucléaires (SF-1, ER, PR, AR...) et réprime leur transactivation. Le mécanisme de répression transcriptionnelle de DAX-1 est assez méconnu, mais l'on peut supposer que DAX-1 recruterait des corépresseurs ou des protéines avec activité HDAC, et/ou DAX-1 pourrait interférer directement avec les facteurs de transcription généraux. Dans le cytoplasme, DAX-1 est associé aux polyribosomes actifs *via* son interaction avec l'ARN polyA. Dans le cas des mutants AHC (partie inférieure), le repliement de la protéine est perturbé. La protéine mutante est majoritairement cytoplasmique et a perdu son activité de liaison à l'ARN. De plus, elle a aussi perdu son activité de répression transcriptionnelle. Cette perte de fonction de DAX-1 empêche la formation correcte des glandes surrénales et entraîne l'apparition de l'AHC.



# Bibliographie

---

## Bibliographie

### A

Achermann, J. C., Ito, M., Hindmarsh, P. C. and Jameson, J. L. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22, 125-6.

Achermann, J. C., Ito, M., Silverman, B. L., Habiby, R. L., Pang, S., Rosler, A. and Jameson, J. L. (2001). Missense mutations cluster within the carboxyl-terminal region of DAX-1 and impair transcriptional repression. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3171-5.

Achermann, J. C., Ozisik, G., Ito, M., Orun, U. A., Harmanci, K., Gurakan, B. and Jameson, J. L. (2002). Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1829-33.

Agoulnik, I. U., Krause, W. C., Bingman, W. E., 3rd, Rahman, H. T., Amrikachi, M., Ayala, G. E. and Weigel, N. L. (2003). Repressors of androgen and progesterone receptor action. *J Biol Chem* 278, 31136-48.

Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veysière, G., Jean, C. and Martinez, A. (2001). SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 15, 93-111.

Altincicek, B., Tenbaum, S. P., Dressel, U., Thormeyer, D., Renkawitz, R. and Baniahmad, A. (2000). Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated by mutations of DAX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita. *J Biol Chem* 275, 7662-7.

Aranda, A. and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-304.

### B

Bae, D. S., Schaefer, M. L., Partan, B. W. and Muglia, L. (1996). Characterization of the mouse DAX-1 gene reveals evolutionary conservation of a unique amino-terminal motif and widespread expression in mouse tissue. *Endocrinology* 137, 3921-7.

Baek, S. H. and Rosenfeld, M. G. (2004). Nuclear receptor coregulators: their modification codes and regulatory mechanism by translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 707-14.

Baker, K. D., Shewchuk, L. M., Kozlova, T., Makishima, M., Hassell, A., Wisely, B., Caravella, J. A., Lambert, M. H., Reinking, J. L., Krause, H. et al. (2003). The *Drosophila*

orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell* 113, 731-42.

Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K. C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E. R., Fraccaro, M. et al. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7, 497-501.

Bartley, J. A., Miller, D. K., Hayford, J. T. and McCabe, E. R. (1982). Concordance of X-linked glycerol kinase deficiency with X-linked congenital adrenal hypoplasia. *Lancet* 2, 733-6.

Bastien, J. and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.

Baumann, C. T., Maruvada, P., Hager, G. L. and Yen, P. M. (2001). Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem* 276, 11237-45.

Biason-Lauber, A. and Schoenle, E. J. (2000). Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet* 67, 1563-8.

Black, B. E., Holaska, J. M., Rastinejad, F. and Paschal, B. M. (2001). DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 11, 1749-58.

Bocquel, M. T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* 17, 2581-95.

Boonyaratanakornkit, V., Melvin, V., Prendergast, P., Altmann, M., Ronfani, L., Bianchi, M. E., Taraseviciene, L., Nordeen, S. K., Allegretto, E. A. and Edwards, D. P. (1998). High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 18, 4471-87.

Borud, B., Mellgren, G., Lund, J. and Bakke, M. (2003). Cloning and characterization of a novel zinc finger protein that modulates the transcriptional activity of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 17, 2303-19.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375, 377-82.

Burke, L. J. and Baniahmad, A. (2000). Co-repressors 2000. *Faseb J* 14, 1876-88.

## C

Cavailles, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J. and Parker, M. G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *Embo J* 14, 3741-51.

Chamoux, E., Narcy, A., Lehoux, J. G. and Gallo-Payet, N. (2002). Fibronectin, laminin, and Collagen IV as Modulators of Cell Behavior during Adrenal Gland Development in the Human Fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1819-1828.

Clipsham, R. and McCabe, E. R. (2003). DAX1 and its network partners: exploring complexity in development. *Mol Genet Metab* 80, 81-120.

Clipsham, R., Niakan, K. and McCabe, E. R. (2004). Nr0b1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis. *Gene Expr Patterns* 4, 3-14.

Codina, A., Benoit, G., Gooch, J. T., Neuhaus, D., Perlmann, T. and Schwabe, J. W. (2004). Identification of a novel co-regulator interaction surface on the ligand binding domain of Nurr1 using NMR footprinting. *J Biol Chem* 279, 53338-45.

Committee, N. R. N. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161-3.

Correa, R. V., Domenice, S., Bingham, N. C., Billerbeck, A. E., Rainey, W. E., Parker, K. L. and Mendonca, B. B. (2004). A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1767-72.

Crawford, P. A., Dorn, C., Sadovsky, Y. and Milbrandt, J. (1998). Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 18, 2949-56.

## D

Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J. and Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12, 3343-56.

DeFranco, D. B. (2002). Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* 16, 1449-55.

Desclozeaux, M., Krylova, I. N., Horn, F., Fletterick, R. J. and Ingraham, H. A. (2002). Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 22, 7193-203.

Dorn, C., Ou, Q., Svaren, J., Crawford, P. A. and Sadovsky, Y. (1999). Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1. *J Biol Chem* 274, 13870-6.

Dressel, U., Thormeyer, D., Altincicek, B., Paululat, A., Eggert, M., Schneider, S., Tenbaum, S. P., Renkawitz, R. and Baniahmad, A. (1999). Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19, 3383-94.

## E

Eckey, M., Tenbaum, S. P., Munoz, A. and Baniahmad, A. (2003). Mixed lineage kinase 2 enhances trans-repression of Alien and nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol* 213, 71-8.

## F

Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J. et al. (2004). Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol* 18, 127-41.

Fejes-Toth, G., Pearce, D. and Naray-Fejes-Toth, A. (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2973-8.

Feng, W., Ribeiro, R. C., Wagner, R. L., Nguyen, H., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., Kushner, P. J. and West, B. L. (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280, 1747-9.

Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H. S., Eng, F., Bertos, N. R., Pelletier, N. et al. (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* 11, 139-50.

Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C. et al. (2003). Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol* 23, 8563-75.

## G

Georget, V., Lobaccaro, J. M., Terouanne, B., Mangeat, P., Nicolas, J. C. and Sultan, C. (1997). Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 129, 17-26.

Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-9.

Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-41.

Gorlich, D. and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-60.

Gorlich, D. and Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-8.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-9.

Gronemeyer, H. and Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2, 1173-308.

Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M. and Milgrom, E. (1991). Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *Embo J* 10, 3851-9.

Guo, W., Burris, T. P. and McCabe, E. R. (1995). Expression of DAX-1, the gene responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, in the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis. *Biochem Mol Med* 56, 8-13.

Gurates, B., Amsterdam, A., Tamura, M., Yang, S., Zhou, J., Fang, Z., Amin, S., Sebastian, S. and Bulun, S. E. (2003). WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom gene expression in gonadal cells. *Mol Cell Endocrinol* 208, 61-75.

Gurates, B., Sebastian, S., Yang, S., Zhou, J., Tamura, M., Fang, Z., Suzuki, T., Sasano, H. and Bulun, S. E. (2002). WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4369-77.

## H

Habiby, R. L., Boepple, P., Nachtigall, L., Sluss, P. M., Crowley, W. F., Jr. and Jameson, J. L. (1996). Adrenal hypoplasia congenita with hypogonadotropic hypogonadism: evidence that DAX-1 mutations lead to combined hypothalamic and pituitary defects in gonadotropin production. *J Clin Invest* 98, 1055-62.

Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L. and Ingraham, H. A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3, 521-6.

Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan, T., Salas-Cortes, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P. et al. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91, 403-7.

Hanley, N. A., Rainey, W. E., Wilson, D. I., Ball, S. G. and Parker, K. L. (2001). Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol* 15, 57-68.

Hasegawa, T., Fukami, M., Sato, N., Katsumata, N., Sasaki, G., Fukutani, K., Morohashi, K. and Ogata, T. (2004). Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5930-5.

Ho, J., Zhang, Y. H., Huang, B. L. and McCabe, E. R. (2004). NR0B1A: an alternatively spliced form of NR0B1. *Mol Genet Metab* 83, 330-6.

Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-41.

Holter, E., Kotaja, N., Makela, S., Strauss, L., Kietz, S., Janne, O. A., Gustafsson, J. A., Palvimo, J. J. and Treuter, E. (2002). Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol Endocrinol* 16, 515-28.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Hossain, A., Li, C. and Saunders, G. F. (2004). Generation of two distinct functional isoforms of dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X chromosome gene 1 (DAX-1) by alternative splicing. *Mol Endocrinol* 18, 1428-37.

Hoyle, C., Narvaez, V., Alldus, G., Lovell-Badge, R. and Swain, A. (2002). Dax1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. *Mol Endocrinol* 16, 747-56.

Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D. L. and Hager, G. L. (1996). Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4845-50.

Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R. and Hager, G. L. (1999). Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell* 10, 471-86.

## I

Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T. J., Hentges, K. E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K. T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G. et al. (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 10, 1261-72.

Ikeda, Y., Takeda, Y., Shikayama, T., Mukai, T., Hisano, S. and Morohashi, K. I. (2001). Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn* 220, 363-76.

Ito, M., Yu, R. and Jameson, J. L. (1997). DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 17, 1476-83.

Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H. and Imai, K. (2002). Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 16, 2382-92.

## J

Jacob, A. L., Lund, J., Martinez, P. and Hedin, L. (2001). Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *J Biol Chem* 276, 37659-64.

Jameson, J. L. (2004). Of mice and men: The tale of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5927-9.

Jenster, G., van der Korput, H. A., van Vroonhoven, C., van der Kwast, T. H., Trapman, J. and Brinkmann, A. O. (1991). Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 5, 1396-404.

Jepsen, K. and Rosenfeld, M. G. (2002). Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci* 115, 689-98.

Jordan, B. K., Mohammed, M., Ching, S. T., Delot, E., Chen, X. N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P. N., Elejalde, B. R. and Vilain, E. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 68, 1102-9.

## K

Karin, M. (1998). New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 93, 487-90.

Kawabe, K., Shikayama, T., Tsuboi, H., Oka, S., Oba, K., Yanase, T., Nawata, H. and Morohashi, K. (1999). Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Mol Endocrinol* 13, 1267-84.

Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, M. and Morohashi, K. (2003). Role of the LXXLL-motif and activation function 2 domain in subcellular localization of Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1). *Mol Endocrinol* 17, 994-1004.

Kawata, M., Matsuda, K., Nishi, M., Ogawa, H. and Ochiai, I. (2001). Intracellular dynamics of steroid hormone receptor. *Neurosci Res* 40, 197-203.

Keegan, C. E. and Hammer, G. D. (2002). Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* 13, 200-8.

Kim, J., Prawitt, D., Bardeesy, N., Torban, E., Vicaner, C., Goodyer, P., Zabel, B. and Pelletier, J. (1999). The Wilms' tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 2289-99.

Kim, J. W., Peng, N., Rainey, W. E., Carr, B. R. and Attia, G. R. (2004). Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3042-7.

Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Yamamoto, H., Kikuchi, A. et al. (2004). Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Mol Endocrinol* 18, 2451-62.

Koskimies, P., Levallet, J., Sipila, P., Huhtaniemi, I. and Poutanen, M. (2002). Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1. *Endocrinology* 143, 909-19.

Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12, 198-209.

Kraus, W. L. and Wong, J. (2002). Nuclear receptor-dependent transcription with chromatin. Is it all about enzymes? *Eur J Biochem* 269, 2275-83.

Krylova, I. N., Sablin, E. P., Moore, J., Xu, R. X., Waitt, G. M., MacKay, J. A., Juzumiene, D., Bynum, J. M., Madauss, K., Montana, V. et al. (2005). Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120, 343-55.

---

**L**

Lalli, E., Bardoni, B., Zazopoulos, E., Wurtz, J. M., Strom, T. M., Moras, D. and Sassone-Corsi, P. (1997). A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 11, 1950-60.

Lalli, E., Melner, M. H., Stocco, D. M. and Sassone-Corsi, P. (1998). DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 139, 4237-43.

Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C. and Sassone-Corsi, P. (2000). Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 4910-21.

Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (2003). DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. *Mol Endocrinol* 17, 1445-53.

Lanz, R. B., McKenna, N. J., Onate, S. A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.

Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-26.

Layman, L. C. (1999). Genetics of human hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Med Genet* 89, 240-8.

Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P. and Michel, D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* 143, 3482-9.

Lehmann, S. G., Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (2002). X-linked adrenal hypoplasia congenita is caused by abnormal nuclear localization of the DAX-1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8225-30.

Lehmann, S. G., Wurtz, J. M., Renaud, J. P., Sassone-Corsi, P. and Lalli, E. (2003). Structure-function analysis reveals the molecular determinants of the impaired biological function of DAX-1 mutants in AHC patients. *Hum Mol Genet* 12, 1063-72.

Lekawanvijit, S., Thamprasert, K. and Settakorn, J. (2002). Adrenal hypoplasia congenita : report of an autopsy case. *Chiang Mai Medical Bulletin* 41, 97.

Li, Y., Choi, M., Cavey, G., Daugherty, J., Suino, K., Kovach, A., Bingham, N. C., Kliewer, S. A. and Xu, H. E. (2005). Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. *Mol Cell* 17, 491-502.

Lim, C. S., Baumann, C. T., Htun, H., Xian, W., Irie, M., Smith, C. L. and Hager, G. L. (1999). Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol* 13, 366-75.

Lin, L. and Achermann, J. C. (2004). Inherited adrenal hypoplasia: not just for kids! *Clin Endocrinol (Oxf)* 60, 529-37.

Lopez, D., Shea-Eaton, W., Sanchez, M. D. and McLean, M. P. (2001). DAX-1 represses the high-density lipoprotein receptor through interaction with positive regulators sterol regulatory element-binding protein-1a and steroidogenic factor-1. *Endocrinology* 142, 5097-106.

Ludbrook, L. M. and Harley, V. R. (2004). Sex determination: a 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab* 15, 116-21.

Luo, X., Ikeda, Y. and Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-90.

## M

Mallet, D., Bretones, P., Michel-Calemard, L., Dijoud, F., David, M. and Morel, Y. (2004). Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4829-32.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9.

Mantovani, G., Ozisik, G., Achermann, J. C., Romoli, R., Borretta, G., Persani, L., Spada, A., Jameson, J. L. and Beck-Peccoz, P. (2002). Hypogonadotropic hypogonadism as a presenting feature of late-onset X-linked adrenal hypoplasia congenita. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 44-8.

Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L. and Yen, P. M. (2003). Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 278, 12425-32.

McKenna, N. J., Lanz, R. B. and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-44.

Meeks, J. J., Crawford, S. E., Russell, T. A., Morohashi, K., Weiss, J. and Jameson, J. L. (2003). Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 130, 1029-36.

Meeks, J. J., Weiss, J. and Jameson, J. L. (2003). Dax1 is required for testis determination. *Nat Genet* 34, 32-3.

Merke, D. P., Tajima, T., Baron, J. and Cutler, G. B., Jr. (1999). Hypogonadotropic hypogonadism in a female caused by an X-linked recessive mutation in the DAX1 gene. *N Engl J Med* 340, 1248-52.

Mesiano, S. and Jaffe, R. B. (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 18, 378-403.

Michigami, T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S. and Ozono, K. (1999). Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem* 274, 33531-8.

Mizusaki, H., Kawabe, K., Mukai, T., Ariyoshi, E., Kasahara, M., Yoshioka, H., Swain, A. and Morohashi, K. (2003). Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 17, 507-19.

Montano, M. M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P. and Katzenellenbogen, B. S. (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6947-52.

Moore, J. M., Galicia, S. J., McReynolds, A. C., Nguyen, N. H., Scanlan, T. S. and Guy, R. K. (2004). Quantitative proteomics of the thyroid hormone receptor-coregulator interactions. *J Biol Chem* 279, 27584-90.

Moraitis, A. N., Giguere, V. and Thompson, C. C. (2002). Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol* 22, 6831-41.

Moras, D. and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-91.

Mukai, T., Kusaka, M., Kawabe, K., Goto, K., Nawata, H., Fujieda, K. and Morohashi, K. (2002). Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex. *Genes Cells* 7, 717-29.

Muscatelli, F., Strom, T. M., Walker, A. P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W. et al. (1994). Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372, 672-6.

## N

Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D. and Ingraham, H. A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93, 445-54.

Naville, D., Penhoat, A., Durand, P. and Begeot, M. (1999). Three steroidogenic factor-1 binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 28-33.

Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-87.

Nishida, T. and Yasuda, H. (2002). PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 277, 41311-7.

## O

Olefsky, J. M. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276, 36863-4.

Ozisik, G., Mantovani, G., Achermann, J. C., Persani, L., Spada, A., Weiss, J., Beck-Peccoz, P. and Jameson, J. L. (2003). An alternate translation initiation site circumvents an amino-terminal DAX1 nonsense mutation leading to a mild form of X-linked adrenal hypoplasia congenita. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 417-23.

## P

Parker, K. L. and Schimmer, B. P. (1997). Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18, 361-77.

Parma, P., Pailhoux, E., Puissant, C. and Cotinot, C. (1997). Porcine Dax-1 gene: isolation and expression during gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 135, 49-58.

Pask, A., Toder, R., Wilcox, S. A., Camerino, G. and Graves, J. A. (1997). The candidate sex-reversing DAX1 gene is autosomal in marsupials: implications for the evolution of sex determination in mammals. *Genomics* 41, 422-6.

Patel, M., Dorman, K. S., Zhang, Y. H., Huang, B. L., Arnold, A. P., Sinsheimer, J. S., Vilain, E. and McCabe, E. R. (2001). Primate DAX1, SRY, and SOX9: evolutionary stratification of sex-determination pathway. *Am J Hum Genet* 68, 275-80.

Patel, M. V., McKay, I. A. and Burrin, J. M. (2001). Transcriptional regulators of steroidogenesis, DAX-1 and SF-1, are expressed in human skin. *J Invest Dermatol* 117, 1559-65.

Peng, N., Kim, J. W., Rainey, W. E., Carr, B. R. and Attia, G. R. (2003). The role of the orphan nuclear receptor, liver receptor homologue-1, in the regulation of human corpus luteum 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 6020-8.

Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-50.

Phelan, J. K. and McCabe, E. R. (2001). Mutations in NR0B1 (DAX1) and NR5A1 (SF1) responsible for adrenal hypoplasia congenita. *Hum Mutat* 18, 472-87.

Pratt, W. B. and Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-60.

---

**R**

Ramayya, M. S., Zhou, J., Kino, T., Segars, J. H., Bondy, C. A. and Chrousos, G. P. (1997). Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1799-806.

Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378, 681-9.

Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M. and Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17, 554-6.

Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15, 355-66.

**S**

Sablin, E. P., Krylova, I. N., Fletterick, R. J. and Ingraham, H. A. (2003). Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* 11, 1575-85.

Sadovsky, Y., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Clements, M. A., Tourtellotte, L. M., Simburger, K. and Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10939-43.

Salvi, R., Gomez, F., Fiaux, M., Schorderet, D., Jameson, J. L., Achermann, J. C., Gaillard, R. C. and Pralong, F. P. (2002). Progressive onset of adrenal insufficiency and hypogonadism of pituitary origin caused by a complex genetic rearrangement within DAX-1. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4094-100.

Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennstrom, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-40.

Sato, Y., Suzuki, T., Hidaka, K., Sato, H., Ito, K., Ito, S. and Sasano, H. (2003). Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and COUP-TF II, in the normal human ovary: correlation with adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor-1 immunolocalization during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3415-20.

Seminara, S. B., Achermann, J. C., Genel, M., Jameson, J. L. and Crowley, W. F., Jr. (1999). X-linked adrenal hypoplasia congenita: a mutation in DAX1 expands the phenotypic spectrum in males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4501-9.

Seol, W., Choi, H. S. and Moore, D. D. (1996). An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272, 1336-9.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A. and Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-37.

Shibata, H., Ikeda, Y., Mukai, T., Morohashi, K., Kurihara, I., Ando, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Murai, M., Saito, I. et al. (2001). Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab* 74, 206-16.

Simental, J. A., Sar, M., Lane, M. V., French, F. S. and Wilson, E. M. (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266, 510-8.

Smith, C. A., Clifford, V., Western, P. S., Wilcox, S. A., Bell, K. S. and Sinclair, A. H. (2000). Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J Mol Endocrinol* 24, 23-32.

Song, K. H., Park, Y. Y., Park, K. C., Hong, C. Y., Park, J. H., Shong, M., Lee, K. and Choi, H. S. (2004). The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol* 18, 1929-40.

Stocco, D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193-213.

Sugawara, T., Abe, S., Sakuragi, N., Fujimoto, Y., Nomura, E., Fujieda, K., Saito, M. and Fujimoto, S. (2001). RIP 140 modulates transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene through interactions with both SF-1 and DAX-1. *Endocrinology* 142, 3570-7.

Sugita, J., Takase, M. and Nakamura, M. (2001). Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene* 280, 67-74.

Suzuki, T., Kasahara, M., Yoshioka, H., Morohashi, K. and Umesono, K. (2003). LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Mol Cell Biol* 23, 238-49.

Swain, A. and Lovell-Badge, R. (1999). Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev* 13, 755-67.

Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G. and Lovell-Badge, R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761-7.

Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R. and Camerino, G. (1996). Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat Genet* 12, 404-9.

---

**T**

Tabarin, A., Achermann, J. C., Recan, D., Bex, V., Bertagna, X., Christin-Maitre, S., Ito, M., Jameson, J. L. and Bouchard, P. (2000). A novel mutation in DAX1 causes delayed-onset adrenal insufficiency and incomplete hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 105, 321-8.

Tamai, K. T., Monaco, L., Alastalo, T. P., Lalli, E., Parvinen, M. and Sassone-Corsi, P. (1996). Hormonal and developmental regulation of DAX-1 expression in Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 10, 1561-9.

Tong, G. X., Tanen, M. R. and Bagchi, M. K. (1995). Ligand modulates the interaction of thyroid hormone receptor beta with the basal transcription machinery. *J Biol Chem* 270, 10601-11.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. and Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-87.

Tremblay, J. J. and Viger, R. S. (2001). Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod* 64, 1191-9.

**V**

Val, P., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssiere, G. and Martinez, A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1, 8.

Vilain, E., Guo, W., Zhang, Y. H. and McCabe, E. R. (1997). DAX1 gene expression upregulated by steroidogenic factor 1 in an adrenocortical carcinoma cell line. *Biochem Mol Med* 61, 1-8.

**W**

Wang, C., Fu, M., Angeletti, R. H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A. T., Albanese, C., Lisanti, M. P., Katzenellenbogen, B. S., Kato, S., Hopp, T. et al. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276, 18375-83.

Wang, D. S., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Sakai, F., Sudhakumari, C. C., Suzuki, T., Yoshikuni, M., Matsuda, M., Morohashi, K. and Nagahama, Y. (2002). Molecular cloning of DAX1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 632-40.

Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P. and Perlmann, T. (2003). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423, 555-60.

Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. and Gustafsson, J. A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 17, 1901-9.

Wei, X., Sasaki, M., Huang, H., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (2002). The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor 1, regulates neuronal nitric oxide synthase gene expression in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 16, 2828-39.

Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. and Evans, R. M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641-6.

Western, P. S., Harry, J. L., Marshall Graves, J. A. and Sinclair, A. H. (2000). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241, 223-32.

Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3, 87-94.

## X

Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T. et al. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* 415, 813-7.

## Y

Yu, R. N., Achermann, J. C., Ito, M. and Jameson, J. L. (1998). The role of DAX-1 in reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 9, 169-175.

Yu, R. N., Ito, M. and Jameson, J. L. (1998). The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol Endocrinol* 12, 1010-22.

Yu, R. N., Ito, M., Saunders, T. L., Camper, S. A. and Jameson, J. L. (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* 20, 353-7.

---

**Z**

Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R. M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Lazar, M. A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14400-5.

Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., McCabe, E. R. et al. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635-41.

Zazopoulos, E., Lalli, E., Stocco, D. M. and Sassone-Corsi, P. (1997). DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390, 311-5.

Zhang, H., Thomsen, J. S., Johansson, L., Gustafsson, J. A. and Treuter, E. (2000). DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* 275, 39855-9.

Zhang, Y. H., Guo, W., Wagner, R. L., Huang, B. L., McCabe, L., Vilain, E., Burris, T. P., Anyane-Yeboa, K., Burghes, A. H., Chitayat, D. et al. (1998). DAX1 mutations map to putative structural domains in a deduced three-dimensional model. *Am J Hum Genet* 62, 855-64.

Zhu, X. G., Hanover, J. A., Hager, G. L. and Cheng, S. Y. (1998). Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem* 273, 27058-63.



# Annexes

**Annexe 1 : Nomenclature et classification des récepteurs nucléaires (d'après (Committee, 1999) et [http://www.ens-lyon.fr / LBMC/laudet/nurebase/nomenclature/nomenclature\\_table.html](http://www.ens-lyon.fr/LBMC/laudet/nurebase/nomenclature/nomenclature_table.html))**

Sous-familles et Groupes	Genes	Noms Triviaux	Sous-familles et Groupes	Genes	Noms Triviaux
1A	NR1A1	TRa, c-erbA-1, THRA	1I (suite)	NR1I2	ONR1, PXR, SXR, BXR
	NR1A2	TRb, c-erbA-2, THRB		NR1I3	MB67, CAR1, CARa
1B	NR1B1	RARa		NR1I4	CAR2, CARb
	NR1B2	RARb, HAP	1J	NR1J1	DHR96
	NR1B3	RARg, RARD	1K	NR1K1	NHR1
	NR1B4	RAR	2A	NR2A1	HNF4
1C	NR1C1	PPARa		NR2A2	HNF4G
	NR1C2	PPARb, NUC1, PPARd, FAAR		NR2A3	HNF4B
	NR1C3	PPARg		NR2A4	DHNF4, HNF4D
1D	NR1D1	REVERBa, EAR1, EAR1A	2B	NR2B1	RXRA
	NR1D2	REVERBb, EAR1b, BD73, RVR, HZF2		NR2B2	RXRB, H-2RIIBP, RCoR-1
	NR1D3	E75		NR2B3	RXRG
1E	NR1E1	E78, DR-78		NR2B4	USP, Ultraspiracle, 2C1, CF1, RXR1, RXR2
1F	NR1F1	RORa, RZRa	2C	NR2C1	TR2, TR2-11
	NR1F2	RORb, RZRb		NR2C2	TR4, TAK1
	NR1F3	RORg, TOR		NR2C3	TR2-4
	NR1F4	HR3, DHR3, MHR3, GHR3	2D	NR2D1	DHR78
		CNR3, CHR3	2E	NR2E1	TLL, TLX, XTLL
1G	NR1G1	CNR14		NR2E2	TLL, Tailless
1H	NR1H1	ECR		NR2E3	PNR
	NR1H2	UR, OR-1, NER1, RIP15, LXRb		NR2E4	dissatisfaction
	NR1H3	RLD1, LXR, LXRa		NR2E5	fax-1
	NR1H4	FXR, RIP14, HRR1			COUP-TFI, COUPTFA, EAR3, SVP44
	NR1H5	FXRB	2F	NR2F1	
1I	NR1I1	VDR			

2F (suite)	NR2F2	COUP-TFII, COUPTFB, SVP40	ARP1, 0A	NR0A1	KNI, Knirps
	NR2F3	SVP, COUP-TF		NR0A2	KNRL, Knirps related
	NR2F4	COUP-TFIII, COUPTFG		NR0A3	EGON, Embryonic gonad, EAGLE
	NR2F5	SVP46		NR0A4	ODR7
	NR2F6	EAR2		NR0A5	Trithorax
	NR2F7	AmNR7	0B	NR0B1	DAX1, AHCH
2G	NR2G1	HNF, RXR		NR0B2	SHP
2H	NR2H1	AmNR4, AmNR8			
3A	NR3A1	ERa			
	NR3A2	ERb			
3B	NR3B1	ERR1, ERRa			
	NR3B2	ERR2, ERRb			
	NR3B3	ERR3, ERRg			
	NR3B4	Drosophila ERR			
3C	NR3C1	GR			
	NR3C2	MR			
	NR3C3	PR			
	NR3C4	AR			
4A	NR4A1	NGFIB, TR3, N10, NUR77, NAK1			
	NR4A2	NURR1, NOT, RNR1, HZF-3, TINOR			
	NR4A3	NOR1, MINOR			
	NR4A4	DHR38, NGFIB			
		CNR8, C48D5			
5A	NR5A1	SF1, ELP, FTZ-F1, AD4BP			
	NR5A2	LRH1, xFF1rA, xFF1rB, FFLR, PHR, FTF			
	NR5A3	FTZ-F1			
	NR5A4	FF1b			
5B	NR5B1	DHR39, FTZF1B			
6A	NR6A1	GCNF1, RTR			
	NR6A2	HR4, THR4, GRF			

---

**Annexe 2 : Liste des mutations de *DAX-1* identifiées chez des patients avec AHC (d'après Phelan JK et al 2001 modifié et mis à jour).**

**Mutations non-sens :**

Q37X \* (Traduction 84-470 à partir d'un site alternatif d'initiation de la traduction)  
W39X  
Y81X  
Y91X  
C109X  
Y130X  
Y147X  
S153X  
W171X (2 substitutions de nucléotides différentes et un 3<sup>ème</sup> cas où en plus mutation V126M)  
W172X  
Y197X  
W235X (2 substitutions de nucléotides différentes)  
Q252X  
L263X  
Y271X  
Q283X  
Q357X  
W369X  
Q395X  
Y399X  
Q420X  
E428X

**Mutations faux-sens :**

C200W  
L262Q  
R267P  
L278P  
W291C  
L295P  
L297P  
A300P  
A300V  
E377K  
Y380D \*  
L381H  
K382N  
V385G

R425G  
R425T  
I439S \*  
N440I  
L466R

### **Mutations délétions de résidus :**

δV269 délétion en cadre d'un résidu

δL381-V385 délétions en cadre de 5 résidus

### **Mutations décalage du cadre de lecture :**

Del 1pb	Décalage: -1	G40A ... codon 84X
Del 1pb	Décalage: -1	V49W ... codon 84X
Del 2pb	Décalage: -2	E52G ... codon 70X
Del 2pb Ins1pb	Décalage: -1	YA91-92YR ... codon 263X
Ins1pb	Décalage: +1	G106W ... codon 112X
Del 1pb	Décalage: -1	V115W ... codon 263X
Ins 4pb	Décalage: +1	V126A ... codon 138X
Del 1pb	Décalage: -1	C135W ... codon 263X
Ins 1pb	Décalage: +1	H139Q ... codon 152X
Del 1pb	Décalage: -1	RQ141-142RR ... codon 263X
Del 1pb	Décalage: -1	S153Q ... codon 263X
Del 1pb	Décalage: -1	AP159-160AR ... codon 263X
Ins 2pb	Décalage: +2	R166H ... codon 264X
Del 1pb	Décalage: -1	PGG167-169PGA ... codon 263X
Del 23 pb	Décalage: -2	D173A ... codon 176X
Del 1pb	Décalage: -1	PGG181-183PGV ... codon 263X
Ins 4pb	Décalage: +1	GG182-183GP ... codon 185X
Del 1pb	Décalage: -1	G183V ... codon 263X
Ins 1pb	Décalage: +1	GK183-184GX
Del 2 pb	Décalage: -2	K184R ... codon 203X
Ins 4pb	Décalage: +1	G190R ... codon 205X
Del 1pb Ins 2pb	Décalage +1	LL195-196LP ... codon 204X
Del 1pb	Décalage: -1	G210A ... codon 263X
Ins 1pb	Décalage: +1	GS210-211GQ ... codon 298X
Del 1pb	Décalage: -1	PW234-235PG ... codon 263X
Del 11pb	Décalage: -2	P251L ... codon 294X
Del 1pb	Décalage: -1	Q252R ... codon 263X
Ins13pb	Décalage: +1	A258D ... codon 302X
Del 43pb Ins 18	Décalage: -1	L272A ... codon 363X
Del 1pb	Décalage: -1	L280R ...codon 371X
Del 20pb-Ins31pb	Décalage: -1	Q283G ... codon 375X
Del 2pb	Décalage: -2	V309G ... codon 387X
Del 1pb	Décalage: -1	S312W ... codon 371X

---

Ins 2pb	Décalage: +2	S315T ... codon 372X
Del 2pb Ins 1pb	Décalage: -1	G329E ... codon 371X
Del 1pb	Décalage: -1	E377G ... codon 397X
Del 4pb	Décalage: -1	L411V ... codon 416X
Ins 4pb	Décalage: +1	T418D ... codon 425X
Ins 2pb	Décalage: +2	H423P ... codon 437X
Del 1pb	Décalage: -1	S4311 ... codon 436X
Del 1pb	Décalage: -1	N442K ... codon 461X
Del 2pb Ins 1pb	Décalage: -1	D459G ... codon 461X

### **Réarrangement génique**

Réarrangement génique complexe : Del 2,2kb Ins 27pb, les résidus 1 à 389 sont les résidus correspondants à DAX-1, puis les résidus 390 à 429 sont d'autres résidus non apparentés.

Les mutations provoquant un phénotype mineur avec une apparition tardive de la maladie sont indiquées avec un astérisque (\*).



## Résumé

Des mutations du gène *DAX-1* (DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1) sont responsables de l'hypoplasie congénitale surrénalienne (AHC). *DAX-1* fait partie de la famille des récepteurs nucléaires, mais il est orphelin et agit comme répresseur transcriptionnel. Le but de mon travail de thèse était de mieux caractériser *DAX-1* et sa perte de fonction provoquée par les mutations identifiées chez des patients avec AHC. Concernant la distribution intracellulaire de *DAX-1*, les résultats obtenus montrent que *DAX-1* est nucléaire dans la majorité des cellules, mais aussi cytoplasmique et nucléo-cytoplasmique dans quelques cellules. Les répétitions du domaine aminoterminal agissent de façon coopérative pour déterminer la localisation majoritairement nucléaire de *DAX-1*. De plus, toutes les mutations ponctuelles AHC provoquent une réversion de la distribution intracellulaire de *DAX-1* qui est localisée majoritairement dans le cytoplasme et ce même dans un contexte hétérologue. Les mutants AHC de la protéine sont plus sensibles à la digestion limitée à la trypsine ce qui suppose que leur repliement est affecté. Les mutations AHC induisent un mauvais repliement de *DAX-1* qui n'est plus localisée dans le noyau et ne réprime plus l'expression de gènes cibles. Quant à la régulation de la localisation de *DAX-1*, elle n'implique pas le cycle cellulaire, les voies de signalisation de la PKA, PI3 kinase, ERK et p38. Parmi plusieurs stress testés, le choc thermique produit spécifiquement une relocalisation de *DAX-1* dans le cytoplasme. Le choc thermique affecte aussi la solubilité de *DAX-1* qui est diminuée, ainsi que les modifications post-traductionnelles de la protéine. Quant au mécanisme de répression de *DAX-1*, mes résultats démontrent que N-CoR n'est probablement pas un corépresseur de *DAX-1*. De plus, l'étude structure-fonction montre que *DAX-1* semble posséder un mécanisme de répression unique qui diffère de celui des autres membres de la famille des récepteurs nucléaires.

## Summary

Mutations in *DAX-1* gene (DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1) are responsible for the adrenal hypoplasia congenita (AHC). *DAX-1* is a member of the nuclear receptor family, but is an orphan and acts as a transcriptional repressor. The aim of my thesis work was to better characterise *DAX-1* and its loss of function induced by mutations identified in AHC patients. Concerning the intracellular distribution of *DAX-1*, the results obtained show that *DAX-1* is nuclear in the majority of cells, but also cytoplasmic and nucleocytoplasmic in some cells. The aminoterminal repeats act cooperatively to determine the nuclear localization of *DAX-1*. Moreover, all the AHC point mutations induce a reversion in *DAX-1* intracellular distribution which is now mainly localized in the cytoplasm even in a heterologous context. The AHC mutant proteins are more sensitive to limited trypsin digestion which suggests that their folding is affected. The AHC mutations induce an incorrect folding of *DAX-1* that is not anymore localized in the nucleus and can't repress target genes. Cell cycle and the pathways of PKA, PI3kinase, ERK and p38 kinases don't seem to be involved in regulating *DAX-1* localization. Among several stress tested, heat shock induce a specific relocalization of *DAX-1* in the cytoplasm. Heat shock decreases *DAX-1* solubility and changes *DAX-1* post-translational modifications. Regarding *DAX-1* repression mechanism, my results demonstrate that N-CoR probably doesn't work as a *DAX-1* corepressor. Moreover, the structure-function study shows that *DAX-1* seems to act through a unique repression mechanism which differs from the one used by other members of the nuclear receptor family.