

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

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

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

[david.lhote@u-paris.fr](mailto:david.lhote@u-paris.fr)

[vincent.pacini@hotmail.fr](mailto:vincent.pacini@hotmail.fr)

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

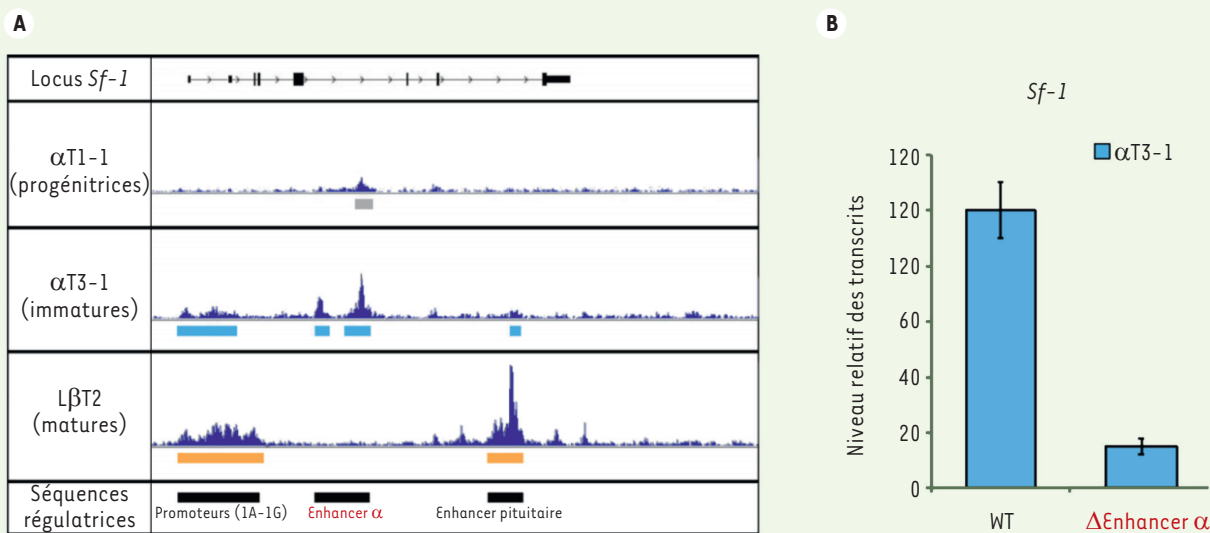
codant les sous-unités  $\beta$  spécifiques des hormones gonadotropes. Ainsi, des mutations du gène *SF-1* humain ou une extinction spécifique de l'expression de *Sf-1* dans l'hypophyse chez la souris entraîne une stérilité [2,3].

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

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

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

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



**Figure 1. Identification de l'enhancer  $\alpha$ , le plus précocement impliqué dans l'expression de *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire.** **A.** « Accessibilité » de la chromatine mesurée par la technique ATAC-seq (assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing) pour le locus du gène *Sf-1* dans les trois lignées modèles de cellules gonadotropes murines immortalisées :  $\alpha T1-1$ ,  $\alpha T3-1$  et LBT2. La hauteur des pics reflète le « degré d'ouverture » de la chromatine. Les régions accessibles de la chromatine ainsi identifiées sont soulignées sous chacune des lignées cellulaires (respectivement en gris, bleu, et jaune). La dernière ligne récapitule, en noir, l'ensemble des régions accessibles de la chromatine identifiées pour l'ensemble des lignées. **B.** Niveaux relatifs des transcrits de *Sf-1* dans les cellules gonadotropes immatures  $\alpha T3-1$  témoins (wild-type, WT) ou ayant subi la délétion de l'enhancer  $\alpha$  ( $\Delta$ Enhancer  $\alpha$ ) mesurés par RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) après normalisation par le taux de transcrits d'un gène de ménage (*Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  SEM (standard error of the mean, ou erreur type de la moyenne) de six expériences indépendantes. Différence statistiquement significative par rapport aux cellules témoins (WT) :  $p < 0,001$ .

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

#### Quels sont les mécanismes épigénétiques contrôlant l'activité de l'enhancer $\alpha$ du gène *Sf-1* ?

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

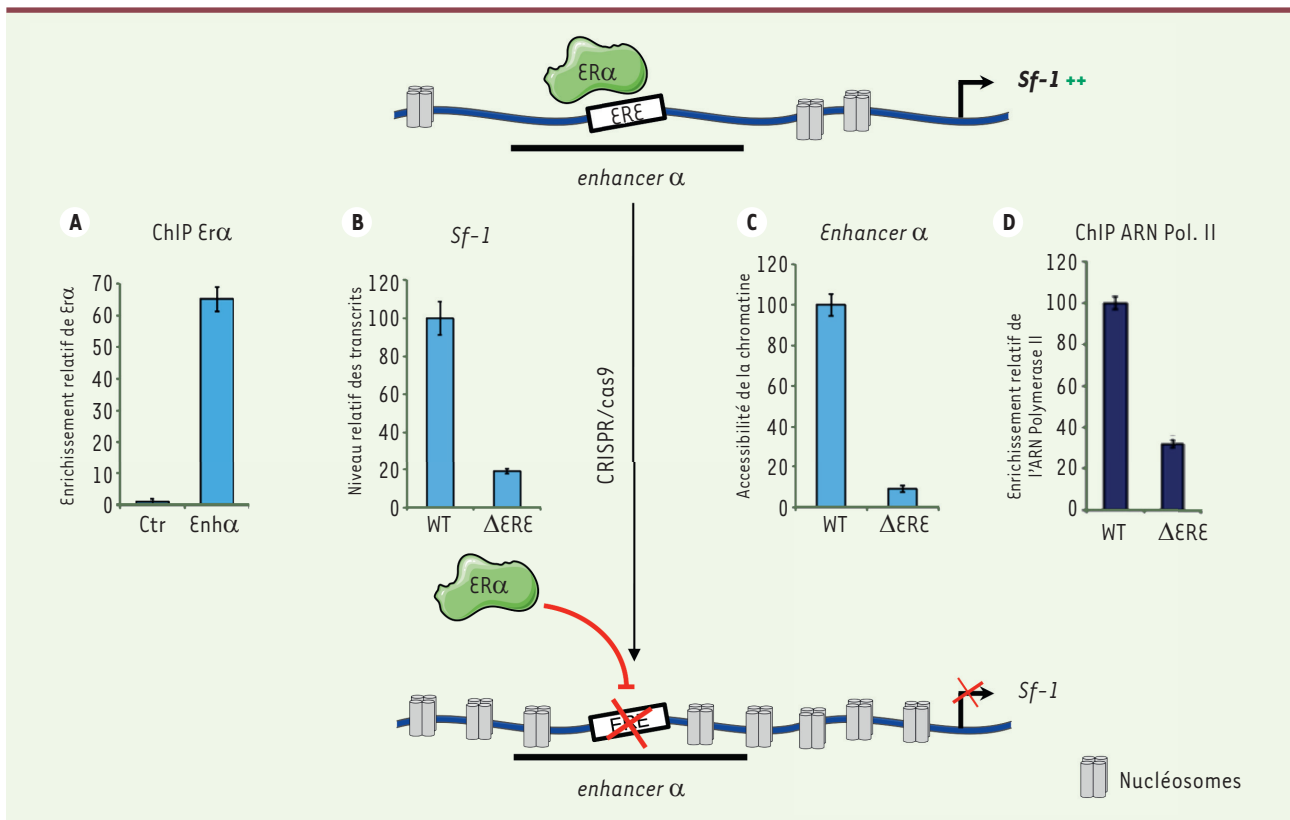
site de fixation de type ERE (estrogen response element) très conservé chez les mammifères. Nous avons déterminé que seul le récepteur  $\alpha$  des œstrogènes (ER $\alpha$ ) est exprimé dans les cellules gonadotropes immatures et vérifié, par immunoprécipitation de la chromatine, qu'il se fixait effectivement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

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

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

#### Conclusion

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



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

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

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

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

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

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

## RÉFÉRENCES

5. Shima Y, Zubair M, Komatsu T, *et al.* Pituitary homeobox 2 regulates adrenal4 binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol* 2008 ; 22 : 1633-46.
6. Laverrière JN, L'Hôte D, Tabouy L, *et al.* Epigenetic regulation of alternative promoters and enhancers in progenitor, immature, and mature gonadotrope cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2016 ; 434 : 250-65.
7. Pacini V, Petit F, Quérat B, *et al.* Identification of a pituitary ER $\alpha$ -activated enhancer triggering the expression of Nr5a1, the earliest gonadotrope lineage-specific transcription factor. *Epigenet Chromatin* 2019 ; 12 : 48
8. Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 228 : 1-21.

