

## **T**pit, un nouveau membre de la famille des gènes à boîte T, est impliqué dans la déficience isolée en ACTH

*Les facteurs impliqués dans le développement de l'hypophyse et la différenciation des cellules hypophysaires sont de mieux en mieux connus. Ainsi, Tpit est un nouveau membre récemment identifié de la famille des facteurs de transcription à boîte T dont l'expression est restreinte aux cellules hypophysaires qui produisent la proopiomélanocortine (POMC), précurseur de l'ACTH*

*dans les cellules corticotropes et de l' $\alpha$ -MSH dans les cellules mélanotropes. Il provoque, en coopération avec le facteur Pitx1, la transcription du gène codant pour la POMC, et joue un rôle majeur dans la différenciation des cellules corticotropes, comme en témoigne le déficit isolé en ACTH provoqué par la mutation du gène Tpit.*

La glande hypophysaire joue un rôle essentiel pour le maintien de l'homéostasie chez les vertébrés en intégrant les signaux provenant de l'hypothalamus et en contrôlant le métabolisme, la reproduction et la croissance. Cette glande endocrine est composée de six types cellulaires qui produisent chacun une hormone différente : les thyrotropes (l'hormone thyroïdienne, TSH), les somatotropes (l'hormone de croissance, GH), les lactotropes (la prolactine, PRL), les gonadotropes (les gonadotropines, LH/FSH), les mélanotropes (la mélanotropine,  $\alpha$ -MSH) et les corticotropes (la corticotropine, ACTH). L'ACTH et l' $\alpha$ -MSH sont toutes deux produites à partir du même précurseur, la proopiomélanocortine (POMC), qui provient d'un seul gène exprimé dans les deux lignées différentes. Les lignées hypophysaires se différencient séquentiellement à partir d'un primum commun, la poche de Rathke, qui dérive du stomodéum. Certains facteurs de transcription tels que Pitx1/2, Rpx (Hesx1) et Lim3 (Lhx3), sont associés aux événements précoces de l'induction et de la morphogénèse hypophysaire tandis que d'autres facteurs jouent un rôle dans la différenciation de

lignées particulières. Par exemple, Prop1 et Pit1 sont importants pour la différenciation des somatotropes, des lactotropes et des thyrotropes alors que SF1 est nécessaire à la différenciation des gonadotropes [1].

Le mécanisme de différenciation des cellules corticotropes demeurerait jusqu'à récemment le moins bien compris de l'hypophyse. Plusieurs hypothèses ont tenté d'en expliquer l'origine et le processus, mais aucun facteur connu ne joue un rôle spécifique dans la différenciation de cette lignée. Pitx1 et NeuroD1 étaient tous deux connus pour leur importance dans la transcription histo-spécifique du gène de la POMC [2-4]. Pourtant, leur présence n'est pas suffisante pour induire la différenciation terminale de cette lignée (communication personnelle). D'autre(s) facteur(s) devai(en)t donc être impliqué(s) dans ce processus.

### **Identification d'un nouveau facteur à boîte T**

Nous avons identifié le facteur de transcription Pitx1 par sa liaison à un élément de contrôle du promoteur de la POMC [2]. Cet élément, que nous avons nommé CE3, confère une activité au gène de la POMC, de façon

spécifique dans l'hypophyse. Toutefois, comme Pitx1 est exprimé dans toutes les lignées cellulaires de l'hypophyse [5], il ne peut à lui seul conférer la spécificité cellulaire d'expression de la POMC. Nous avons identifié une séquence contiguë au site de liaison de Pitx1 qui, lorsque mutée, rend l'élément CE3 totalement inactif. La séquence contenue dans cette région, TCACACCA, est presque identique au demi site de liaison de l'élément T, une séquence palindromique reconnue par les facteurs de transcription de la famille des boîtes T. Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle un de ces facteurs devait lier le promoteur de la POMC. L'utilisation d'oligonucléotides dégénérés correspondant à la partie la plus conservée de ce type de facteurs de transcription, la boîte T (domaine de liaison à l'ADN), nous a permis de cloner un nouveau membre de cette famille, Tpit, à partir d'ADNc de cellules AtT-20, un modèle de cellules corticotropes [6].

### **La famille des gènes à boîte T**

Les facteurs à boîte T forment une famille de facteurs de transcription qui semblent être au nombre de 19 dans le génome humain (Tableau I).

**Tableau I.** Gènes à boîte T présents dans le génome humain.

Gène	Localisation chromosomique	Site principal d'expression (homme ou souris)	Maladie associée	Réf.
T (brachyury)	6q27	mésoderme postérieur et axial durant la gastrulation		
TBR1	2q23-q37	cerveau		
EOMES (TBR2)	3p21.3-p21.2	cerveau		
TBX1	22q11.21	arche branchiale, vésicule otique, poumon	Syndrome de DiGeorge	[15,16]
TBX2	17q23	profil complexe	Amplifié dans le cancer du sein	[29]
TBX3	12q24.1	profil complexe	Syndrome radiomammaire de type Pallister (syndrome de Schinzel)	[17]
TBX3-iso	12			
TBX4	17q21-q22	membres postérieurs		
TBX5	12q24.1	cœur, membres antérieurs, yeux	Syndrome de Holt-Horam	[18,19]
TBX6	16p11.2	sillon primitif, mésoderme paraxial, cellules précurseurs des somites, bourgeon de la queue	knock-out: trois tubes neuraux	[30]
TBX7				
TBX10	11q13			
TBX15	1p13	région cranio-faciale, membres		
TBX18	6q14-q15	organe proépical, épicarde du cœur		
Tpit (TBX19)	1q23-q24	cellules POMC de l'hypophyse	Déficiences isolées en ACTH	[6]
TBX20	7p15-p14	cœur, yeux, neurones du rhombencéphale et colonne vertébrale		
Tbet (TBX21)	17	lymphocytes, rate, poumons et cellules NK, différenciation des lymphocytes Th1		
TBX22	Xq21.1			
TBX23	1			

Données recueillies à l'aide des banques de données publiques du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>).

Plusieurs membres ont été associés à des rôles de *patterning* durant le développement [7]. Jusqu'à récemment, un seul facteur avait été impliqué dans la différenciation cellulaire. En effet, il a été montré que la protéine Tbet dirige les cellules naïves T auxiliaire (Th) vers la voie de différenciation Th1 et réprime la voie opposée, Th2. Toutefois, le mécanisme impliqué demeure inconnu [8].

Des gènes codant pour des facteurs à boîte T sont présents chez tous les vertébrés, du xénope et du poisson zèbre jusqu'à la souris et l'homme. Des homologues un peu plus divergents ont aussi été identifiés chez le vers *C. elegans* et la drosophile, ce qui suggère que le motif de la boîte T a été conservé au cours de l'évolution [9]. Brachyury est le premier membre de

cette famille qui a été identifié. La mutation Brachyury ou T (*tail*) avait été décrite chez la souris en 1927 par Dobrovolskaïa-Zavadskaa qui avait observé que les mutants hétérozygotes avaient une queue plus courte et parfois tordue [10]. D'autres travaux ont montré que les souris homozygotes avaient des défauts de formation des somites postérieurs, une absence de notochorde, et que leur sillon primitif était nettement épaissi [11-13]. Au début des années 1990, le gène *Brachyury* fut isolé par clonage positionnel. Il a aussi été montré que son patron d'expression correspondait au phénotype retrouvé chez le mutant [14]. Depuis, de nombreux membres de la famille des facteurs à boîte T ont été identifiés et plusieurs d'entre eux ont été associés

à des maladies humaines connues. En effet, des mutations du gène *Tbx1* ont été associées au syndrome de DiGeorge [15, 16], de *Tbx3* au syndrome radiomammaire de type Pallister [17] et de *Tbx5* au syndrome de Holt-Horam [18, 19]. Toutefois, les mécanismes de contrôle des facteurs à boîte T ainsi que ceux de leur action sur des gènes cibles demeurent mal connus.

#### Tpit et Pitx1 sont des partenaires transcriptionnels

Dans la lignée corticotrope de l'hypophyse, Tpit et Pitx1 sont des partenaires essentiels l'un pour l'autre, et activent le promoteur de la POMC de façon synergique. Cette activité synergique semble due à un

effet coopératif entre Tpit et Pitx1 lors de leur interaction avec des sites contigus sur l'ADN de l'élément régulateur CE3 [6].

### L'expression de Tpit est restreinte aux cellules corticotropes de l'hypophyse

L'étude de l'expression de Tpit au cours du développement nous a révélé que son expression est restreinte aux cellules exprimant la POMC dans l'hypophyse et que son apparition précède celle de la POMC [6]. De plus, Tpit n'est pas exprimé dans les autres tissus où l'on retrouve la POMC, tels que les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus [6]. Ces données suggèrent un rôle de Tpit dans la différenciation des cellules POMC hypophysaires. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mis au point une expérience de gain de fonction chez des souris transgéniques (figure 1). A l'aide du promoteur de la sous-unité  $\alpha$ -glycoprotéine ( $\alpha$ -GSU) [20], l'expression de Tpit a été ciblée dans la pointe rostrale de l'hypophyse précoce, une structure transitoire contenant des cellules non différenciées [21] qui expriment de hauts niveaux de Pitx1 [5]. Ces cellules n'expriment normalement pas la POMC, mais expriment de façon transitoire  $\alpha$ -GSU [22]. Cette expression ectopique de Tpit suffit pour induire l'expression de la POMC dans la partie rostrale. Toutefois, d'autres marqueurs des cellules POMC tels que NeuroD1 n'ont pas été induits dans cette expérience, ce qui indique que Tpit suffit *in vivo* pour provoquer la transcription de la POMC dans l'hypophyse, mais que d'autres signaux sont vraisemblablement requis pour la différenciation complète en corticotropes [6].

### Tpit est impliqué dans la déficience isolée en ACTH

Chez l'homme, la POMC est principalement exprimée dans trois tissus : l'hypophyse où l'ACTH est produite pour stimuler la production de glucocorticoïdes par les surrénales, l'hypothalamus où elle contrôle l'appétit, et la peau où elle joue un rôle dans la pigmentation. En 1998,

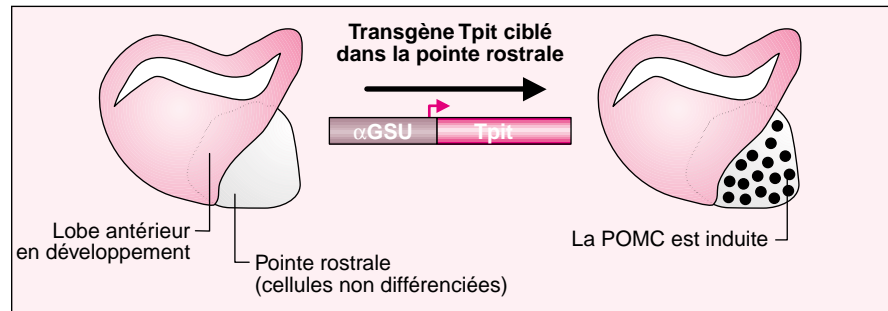


Figure 1. **Présentation schématique de l'expérience de transgénèse.** Un transgène  $\alpha$ GSU-Tpit est utilisé afin de cibler l'expression de Tpit dans la pointe rostrale de l'hypophyse en développement qui exprime de hauts niveaux de Pitx1. Au jour e14.5 du développement fœtal, l'apparition ectopique de la POMC peut être observée dans la partie rostrale de l'hypophyse des souris transgéniques et non chez les souris de type sauvage.

des mutations dans le gène de la POMC ont été identifiées [23]. Les patients affectés ont un triple phénotype qui est bien en relation avec les trois sites d'expression de la POMC : la déficience en glucocorticoïdes, l'obésité et l'absence de pigmentation (*m/s 1998, n° 8/9, p. 955*). Certains enfants présentent une déficience congénitale isolée en ACTH et, conséquemment, une insuffisance surrénalienne [24]. Cette présentation clinique correspond à un seul des symptômes des patients qui ont une mutation dans le gène POMC. De nombreuses hypothèses ou gènes candidats ont été évalués pour expliquer ce déficit isolé en ACTH [25, 26]. L'expression très restreinte de Tpit dans la lignée POMC de l'hypophyse et son rôle dans l'induction de la POMC *in vivo* nous ont amenés à proposer que le gène *TPIT* puisse par sa mutation être responsable de la déficience isolée en ACTH.

Nous avons analysé l'ADN de trois enfants présentant un déficit isolé en ACTH. Des mutations dans le gène *Tpit* ont été identifiées chez deux d'entre eux (figure 2). Ces patients présentent d'ailleurs des symptômes très similaires [24]. Un premier patient porte une mutation ponctuelle homozygote qui introduit un codon stop dans la partie codante du gène *TPIT*, et qui produirait une délétion de la partie carboxy terminale de la protéine. Les parents de

l'enfant atteint sont porteurs de la mutation à l'état hétérozygote et ne semblent pas souffrir d'insuffisance hormonale; cette mutation serait donc récessive. L'autre patient a une mutation ponctuelle dans la partie codant la boîte T, qui change une sérine pour une phénylalanine. Ce résidu est conservé dans tous les gènes à boîtes T connus de toutes les espèces. Cette mutation semble dominante puisque le patient atteint est hétérozygote; la protéine mutante pourrait agir de façon dominant négatif.

### Perspectives

La découverte de Tpit jette un nouvel éclairage sur les mécanismes de différenciation des cellules corticotropes. Il nous faut maintenant identifier les signaux qui induisent l'expression de Tpit. Des travaux récents ont montré que des gradients de facteurs extracellulaires tels les FGF (*fibroblast growth factor*) et les BMP (*bone morphogenic protein*) sont impliqués dans la différenciation des lignées hypophysaires [27,28]. Le rôle précis de ces signaux dans les corticotropes demeure peu connus. L'identification de Tpit permet de proposer une cible pour l'action de tels signaux extracellulaires et pour leur intégration dans un complexe transcriptionnel spécifique, unique aux lignées corticotrope et mélanotrope ■

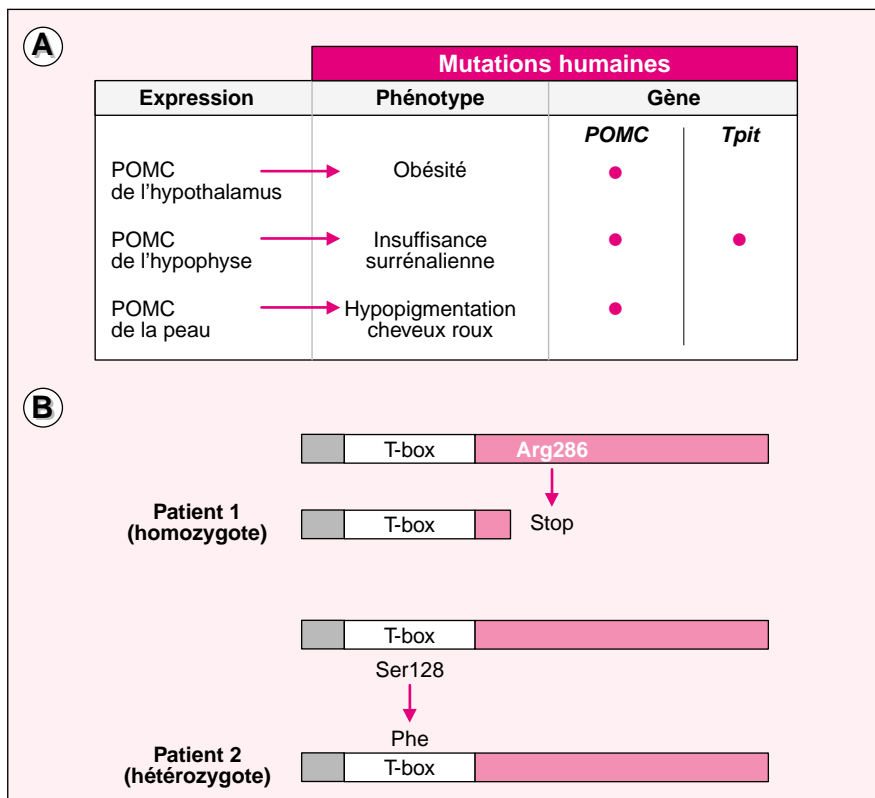


Figure 2. Des mutations du gène TPIT causent une déficience isolée en ACTH. A. Comparaison des phénotypes produits par les mutations dans le gène codant pour la POMC ou le gène TPIT. B. Représentation schématique des mutations identifiées dans le gène TPIT chez deux patients présentant un déficit isolé en ACTH [6]. Le patient 2 est de la même fratrie que le cas décrit par Malpuech et al. [24].

## RÉFÉRENCES

- Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA. Genealogy of the anterior pituitary gland: tracing a family tree. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 343-52.
- Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, et al. PTX1, a bicoid-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* 1996; 10: 1284-95.
- Poulin G, Turgeon B, Drouin J. NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6673-82.
- Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, Drouin J. Specific protein: protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4826-37.
- Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J. Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 1999; 140: 1416-22.
- Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, et al. A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 2001; 104: 849-59.
- Smith J. T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet* 1999; 15: 154-8.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655-69.
- Smith J. Brachyury and the T-box genes. *Curr Genet Dev* 1997; 7: 474-80.
- Dobrovolskaïa-Zavadskaa N. Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère héréditaire « non viable ». *CR Soc Biol* 1927; 97: 114-6.
- Chesley P. Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *J Exp Zool* 1935; 70: 429-59.
- Gluecksohn-Schoenheimer S. The development of two tailless mutants in the house mouse. *Genetics* 1938; 23: 573-84.
- Gruneberg H. Genetical studies on the skeleton of the mouse. XXIII. The development of Brachyury and Anury. *J Embryol Exp Morph* 1958; 6: 424-43.
- Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 1990; 343: 617-22.
- Merscher S, Funke B, Epstein JA, et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge Syndrome. *Cell* 2001; 104: 619-29.
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001; 410: 97-101.
- Bamshad M, Le T, Watkins WS, et al. The spectrum of mutations in TBX3: genotype/phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet (Chicago)* 1999; 64: 1550-62.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 1997; 15: 30-5.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 1997; 15: 21-9.
- Kendall SK, Gordon DF, Birkmeier TS, et al. Enhancer-mediated high level expression of mouse pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit transgene in thyrotropes, gonadotropes, and developing pituitary gland. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1420-33.
- Nemeskéri A, Sétalo G, Halasz B. Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 534-43.
- Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* 1994; 120: 515-22.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998; 19: 155-7.
- Malpuech G, Vanlieferinghen P, Dechelotte P, et al. Isolated familial adrenocorticotropin deficiency: prenatal diagnosis by maternal plasma estriol assay. *Am J Med Genet* 1988; 29: 125-30.
- Kyllo JH, Collins MM, Vetter KL, et al. Linkage of congenital isolated adrenocorticotropin hormone deficiency to the corticotropin releasing hormone locus using simple sequence repeat polymorphisms. *Am J Med Genet* 1996; 62: 262-7.
- Soo SC, Bain M, Gibson S, et al. Isolated congenital ACTH deficiency: a cleavage enzyme defect? *Clin Endocrinol* 1994; 40: 555-6.

## RÉFÉRENCES

27. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 1998; 125: 1005-15.
28. Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, *et al.* Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis *in vivo*. *Genes Dev* 1998; 12: 1691-704.
29. Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, *et al.* Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* 2000; 26: 291-9.
30. Chapman DL, Papaioannou VE. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6. *Nature* 1998; 391: 695-7.

**Anne-Marie Pulichino**  
**Bruno Lamolet**

*Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de recherches cliniques de Montréal.*

**Thierry Brue**  
**Alain Enjalbert**

*Laboratoire ICNE-UMR 6544, Institut Jean-Roche, Faculté de médecine Nord, boulevard Pierre-Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France.*

**Michel David**

*Centre hospitalier Lyon-Sud, 165, chemin Grand-Revoynet, 69310 Pierre-Bénite, France.*

**Georges Malpuech**

*Département de pédiatrie, Hôtel-Dieu, boulevard Léon-Malfreyt, 63058 Clermont Ferrand Cedex France.*

**Jacques Drouin**

*Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110, avenue des Pins-Ouest, Montréal QC, Canada H2W 1R7.*

## TIRÉS À PART

J. Drouin.

*m/s n° 11, vol. 17, novembre 2001*