

***L*inactivation du chromosome X et imprinting de l'Igf-2-R : un mécanisme comparable lié à des ARN non codants ?**

Chez les mammifères, la drosophile et le nématode *Caenorhabditis elegans*, la disparité du stock chromosomique sexuel rend nécessaire la compensation du dosage génique entre le mâle et la femelle pour les gènes portés par le chromosome X. La drosophile a résolu son problème en suractivant les gènes du seul X chez le mâle (*m/s n° 6/7, vol. 13, p. 912*) et le nématode en réduisant de moitié la transcription des gènes des deux chromosomes chez l'individu XX [1].

Les mammifères ont choisi une autre voie qui est celle de l'inactivation d'un chromosome chez la femelle, phénomène caractérisé par M.F. Lyon [2]. Il apparaît que cette inactivation d'un des deux chromosomes X (d'origine paternelle ou maternelle) se réalise de façon aléatoire chez l'embryon alors que, dans les annexes embryonnaires, le X paternel est inactivé de façon cohérente [3]. Ce phénomène se rapproche, s'il n'est pas tout à fait similaire dans sa finalité (encore que nous verrons plus loin qu'il n'en est peut-être pas tout à fait éloigné) du phénomène de l'empreinte génétique (*genetic imprinting*) qui marque de façon relativement indélébile certains gènes selon leur origine paternelle ou maternelle [4]. Ainsi en est-il de 16 gènes (revue dans [5]) dont 5 sont d'expression maternelle et 11 d'expression paternelle.

Des phénomènes de méthylation paraissent jouer un rôle capital dans l'expression paternelle ou maternelle de ces gènes. Une vague de déméthylation générale survient au cours du clivage du blastocyte, puis le patron

des méthylations caractéristiques du génome des mammifères est établi aux environs de la gastrulation après l'implantation (revue dans [6]). Cependant certains gènes échappent à la déméthylation généralisée dont 3 (*Igf2-R*, *XIST* et *H19*) sont précisément des gènes affectés par le phénomène d'empreinte ou de l'inactivation sélective. Le rôle des méthylations dans l'inactivation de ces gènes a été particulièrement bien démontré par Li *et al.* (Cambridge, MA, USA) [7]: outre son caractère létal, l'absence de méthylation après inactivation du gène de la méthyltransférase produit des bouleversements profonds dans l'expression de 3 gènes soumis à une empreinte génétique: le gène *H19* paternel normalement silencieux est activé, le gène *Igf-2* paternel normalement actif est réprimé tout comme le gène *Igf-2-R* maternel (*m/s n° 2, vol. 10, p. 216; n° 10, vol. 11, p. 1483*). Ces résultats ont conduit les auteurs à admettre que l'activation ou la répression d'un allèle paternel ou maternel relève de deux phénomènes qui peuvent être affectés par la méthylation: soit une méthylation en 5' du gène (c'est le cas d'*H19*), soit une méthylation en 5' ou dans une séquence intronique, cette dernière jouant le rôle de *silencer* car pouvant fixer une molécule répressur lorsque les CpG de cette séquence ne sont pas méthylées. Ainsi le jeu de la méthylation du promoteur et du *silencer* permet d'amplifier les résultats observés.

Mais qu'est-ce qui gouverne de façon plus précise l'inactivation de ces gènes? Une première approche a été

réalisée pour les gènes *H19* et *Igf-2*. Ces deux gènes sont étroitement liés mais, chez l'homme et la souris, le gène *Igf-2* est d'expression paternelle et *H19* d'expression maternelle. De surcroît, *H19* ne code pour aucune séquence protéique. Or, la perte de l'expression du gène *H19* (par méthylation du promoteur) provoque l'expression maternelle du gène de l'*Igf-2*, en particulier dans les tumeurs de Wilms. Ces résultats laissent supposer l'existence d'un phénomène épigénétique par lequel les promoteurs de *H19* et *Igf-2* pourraient entrer en compétition pour un facteur d'activation de la transcription [8, 9].

En revanche, la mise en place de l'inactivation du chromosome X paraît liée à l'expression d'un ARN particulier, l'ARN *XIST* transcrit à partir du *X inactivation center* (XIC): seul le chromosome dont le gène *XIST* est actif est inactivé (*m/s n° 3, vol. 12, p. 409*). De surcroît, ce mécanisme est doué de la capacité de « compter » les chromosomes X, inactivant par exemple deux chromosomes X dans une cellule qui en comporte trois. La transcription de cet ARN que l'on ne peut dire messenger est éminemment dépendante, là encore, de la méthylation de la région située en 5' de *XIST* [10, 11]. Une série de publications très récentes vient d'éclaircir un peu mieux le rôle que joue *XIST* et la façon dont il est lui-même synthétisé. Dans des cellules ES femelles ou mâles on peut observer une très faible production d'ARN *XIST* à partir du ou des deux chromosomes X présents [11]. Lors de la différencia-

tion des ES en corps embryoides, cette production cesse dans les corps embryoides issus des ES mâles mais est exaltée sur le chromosome X inactivé dans les corps embryoides issus des ES femelles. L'introduction d'une séquence de 450 kb contenant XIC/XIST dans l'ADN de cellules ES mâles active la compensation du dosage génique lors de leur différenciation en corps embryoides. De surcroît, l'ARN *XIST* est détecté, soit à

partir du chromosome X normal, soit à partir des séquences *XIST* transgéniques, établissant en cela la présence du « compteur » dans les séquences *XIST* transgéniques [12]. La présence de ces séquences *XIST* et leur transcription en ARN entraînent l'inactivation des gènes autosomiques localisés en *cis* sur le chromosome où s'est intégré *XIST*, confirmant que l'inactivation normale du chromosome X est bien due à la synthèse de

l'ARN *XIST* et de son « écoulement » le long du chromosome [13], provoquant le retard de la réplication de l'ADN du chromosome et la sous-acétylation de l'histone H4, marques caractéristiques de l'inactivation de l'X.

Quels sont les mécanismes présidant à l'élévation rapide du taux des ARN *XIST* sur le chromosome X qui subit l'inactivation? Nous avons vu que dans les cellules ES femelles ou mâles indifférenciées une faible expression de l'ARN *XIST* pouvait être détectée à partir du ou des chromosomes X des ES mâles ou femelles mais cessait sur un seul chromosome X et s'amplifiait sur le deuxième chromosome X des cellules ES femelles lors de leur différenciation [12]. Contrairement à ce que les observations précédentes pouvaient laisser supposer, le choix de l'inactivation du chromosome X ne résulte apparemment pas d'une augmentation de la transcription de l'ARN, mais de sa stabilisation. En effet, dans des cellules ES mâles et des fibroblastes « femelles », la vitesse de transcription des ARN *XIST* est très comparable. En revanche, la demi-vie de l'ARN *XIST* dans des cellules XX somatiques est évaluée à 5-7 heures contre 20-30 minutes dans des cellules ES XY mâles [14, 15]. Il faut donc admettre que la mise en place de l'inactivation du chromosome X se réalise en plusieurs étapes et nécessite plusieurs facteurs différents: des facteurs qui stabilisent l'ARN *XIST* sur le chromosome X inactivé, des facteurs qui restreignent ces facteurs de stabilisation sur le X inactivé et des facteurs qui inhibent totalement la transcription de l'ARN *XIST* sur le chromosome X actif (*figure 1*). Cette hypothèse peut être rapprochée des résultats récemment publiés décrivant trois régions importantes dans la régulation de *XIST*: les 100 paires de bases positionnées juste en amont du gène *XIST* forment un promoteur constitutivement actif, une séquence située 25 kb en amont (formée de répétitions pyrimidines/purines) peut fortement inhiber cette activité promotrice alors qu'une séquence située en 5' de l'ARN *XIST* (constituée de répétitions multiples d'une séquence fortement conservée) pour-

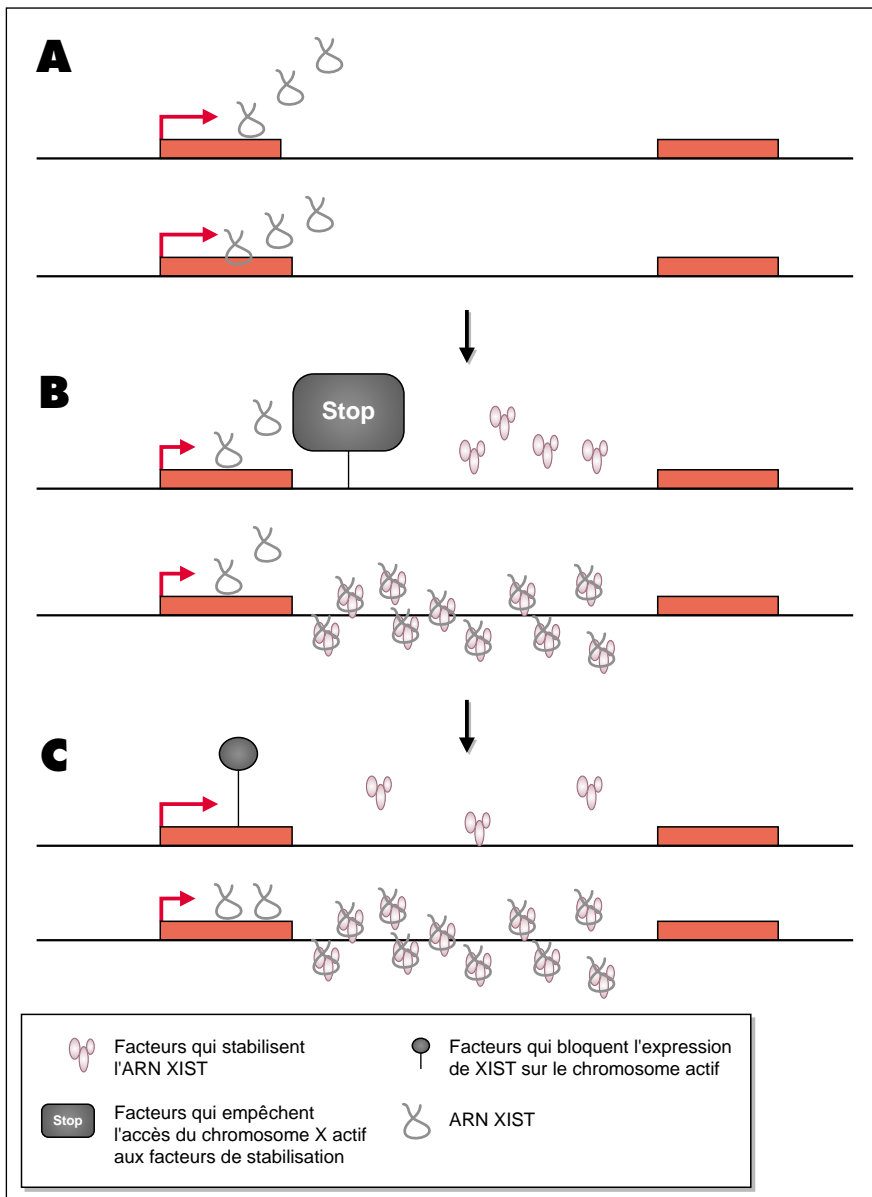


Figure 1. **Expression du gène XIST.** A. Expression faible bi-allélique. B. Expression bi-allélique différentielle. C. Expression monoallélique forte. (D'après [14].)

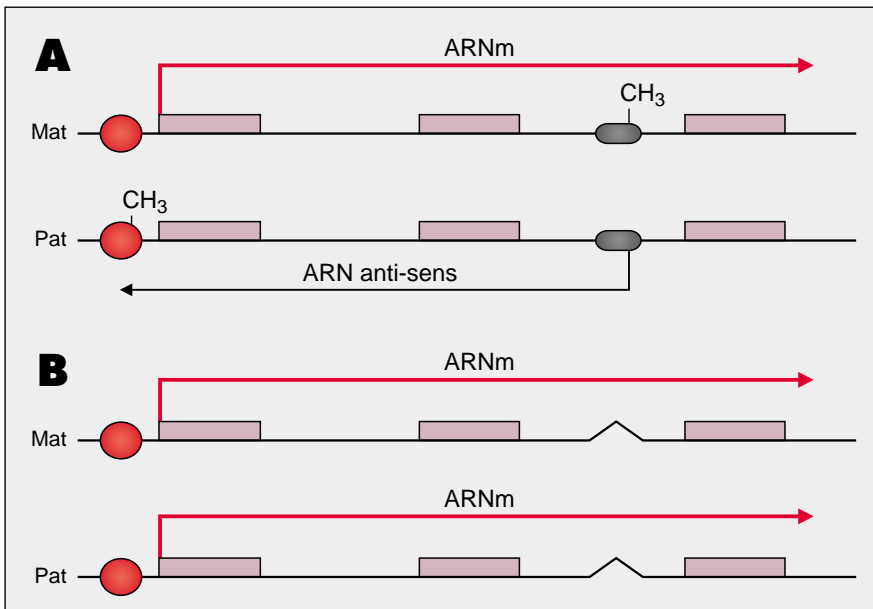


Figure 2. **Transcription de *Igf-2-R*.** **A.** La méthylation de la région intronique du gène *Igf-2-R* permet la transcription de l'ARNm de *Igf-2-R* déclenchée par le promoteur non méthylé du chromosome maternel, alors que le gène *Igf-2-R* du chromosome paternel transcrit un ARN antisens. **B.** Dans le cas où la région intra-intronique du gène *Igf-2-R* est déléetée, les deux gènes paternel et maternel sont transcrits. (D'après [20].)

rait précisément être impliquée dans la stabilisation de cet ARN [16]. Curieusement, un ARN antisens vient d'être impliqué dans l'inactivation du gène de l'*Igf2-R* paternel. Comme rapporté plus haut, l'activation du gène nécessite la non-méthylation de la région promotrice et la méthylation d'une région intragénique, en fait dans le deuxième intron. Dans ces conditions, la transcription de l'ARNm court sur toute la longueur du gène et, en particulier, franchit sans encombre la région méthylée de l'intron 2. Wutz *et al.* (Amsterdam, Pays-Bas) [17], en introduisant un YAC contenant le gène *Igf2-R* par transgénèse chez la souris, observent que la méthylation et l'expression du gène normal sont reproduits selon que le YAC est fourni par le père ou la mère. Mais la délétion de l'intron 2 conduit à la perte de l'empreinte génétique parentale et restaure l'expression bi-allélique du gène quelle que soit l'origine parentale du chromosome. Cela indique donc clairement que cette région joue un rôle capital dans l'expression du gène *Igf-2-R*. Les auteurs ont, de plus, observé que la région de l'intron 2 délétée est elle-même une région

promotrice avec un promoteur situé dans un îlot CpG pour un transcrit antisens: quand l'antisens est exprimé, l'ARNm sens ne l'est pas et *vice versa*, suggérant une forme de compétition réglant l'empreinte génétique du gène de l'*Igf-2-R* (figure 2). De plus, Wutz *et al.* constatent qu'une mutation du promoteur 5' entraîne la déméthylation de la région promotrice de l'intron 2. La compétition entre les deux sens de transcription conduit donc à une sorte de blocage respectif de l'état de méthylation. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'empreinte génétique imposée au gène de l'*Igf-2-R*. L'antisens peut réprimer la transcription normale du gène: (1) par occlusion; (2) par inactivation du chromosome à la manière de *XIST*; (3) par épuisement de facteurs de transcription comme cela semble être le cas pour le couple *H19/Igf2*. L'ensemble de ces études fait donc apparaître un rôle grandissant d'ARN non codant dans l'inactivation de structures génétiques, soit de très grand développement, comme peut l'être le chromosome X, ou plus

réduite, comme le gène de l'*Igf-2-R*. Chez la drosophile mâle, le cas de l'ARN non codant RoX trouvé dans les complexes recouvrant le chromosome X, activateurs dans ce cas, est également une pièce qu'il convient de verser au dossier [18, 19] ■

Jean-Paul Blanchet

Professeur, Centre de génétique moléculaire et cellulaire, UMR 5534, Université Claude-Bernard Lyon I, 43, boulevard du 11-Novembre-1997, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Parkhurst SM, Meneely PM. Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms. *Science* 1994; 264: 924-32.
2. Lyon MF. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190: 372-3.
3. Harper MI, Fosten M, Monk M. Preferential paternal X inactivation in extraembryonic tissues of early mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1982; 112: 407-15.
4. Paldi A, Jami J. L'empreinte génomique: complémentarité fonctionnelle des deux génomes parentaux. *Med Sci* 1991; 7: 247-54.
5. Neumann B, Barlow DP. Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 159-63.
6. Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother. *Trends Genet* 1997; 13: 323-9.
7. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-5.
8. Steenman MJC, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon IL, Feinberg AP. Loss of imprinting of *Igf2* is linked to reduced expression and abnormal methylation of *H19*. *Nat Genet* 1994; 7: 433-9.
9. Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiller J, Efstratiadis A, Tilghman SM. *Nature* 1995; 375: 34-9.
10. Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates *Xist* in somatic cells but not in embryonic cells. *Genes Dev* 1995; 9: 2325-34.
11. Panning B, Jaenisch R. DNA methylation can activate *XIST* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 1996; 10: 1991-2002.

RÉFÉRENCES

12. Lee JT, Strauss WM, Dausman JA, Jaenisch R. A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X inactivation center. *Cell* 1996; 86: 83-94.
13. Herzing LBK, Romer JT, Horn JM, Ashworth A. Xist has properties of the X chromosome inactivation center. *Nature* 1997; 386: 272-5.
14. Panning B, Dausman J, Jaenisch R. X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* 1997; 90: 907-16.
15. Sheardown SA, Duthie SM, Johnston CA, Newall AET, Formstone EJ, Arkell RM, Nesterova TB, Acghisi GC, Rastan S, Brockdorff N. Stabilization of XIST RNA mediates initiation of X chromosome inactivation. *Cell* 1997; 91: 99-107.
16. Hendrich BG, Plenge RM, Willard HF. Identification and characterization of the human XIST promoter: implications for models of X chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res* 1997; 13: 2661-71.
17. Wutz A, Smrzka O, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the Igf2-R gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997; 389: 745-9.
18. Amrein H, Axel R. Genes expressed in neurons of adult male Drosophila. *Cell* 1997; 88: 459-69.
19. Meller VH, Wu KH, Roman G, Kuroda MI, Davis RL. roX1 RNA points the X chromosome of male Drosophila and is regulated by the dosage compensation system. *Cell* 1997; 88: 445-57.
20. Reik W, Constancia M. Making sense or antisense? *Nature* 1997; 389: 669-71.

TIRÉS À PART

J.P. Blanchet.

DISPONIBLE EN VIDÉOCASSETTE

La journée Jean-Claude DREYFUS

RÉCEPTEURS ET MALADIES

Paris le 19 septembre 1997

sur deux vidéocassettes VHS

Nombreux autres congrès, liste sur demande

Pour information, contacter :

Professeur Gérard MELKI

Tél. : 02 99 33 69 64 - Fax : 02 99 33 68 78

E-MAIL : gérard.melki@univ-rennes1.fr



015 Paris,

France