

## Empreinte parentale : « insulateurs » sur commande

Différentes études publiées récemment montrent que l'expression des gènes peut être affectée par des modifications non seulement des éléments classiques de contrôle de la transcription comme les promoteurs, les *enhancers* et les *silencers*, mais également des séquences segmentant les chromosomes en domaines fonctionnellement indépendants et que l'on appelle « insulateurs ». Des modifications de l'activité « insulateur » permettent d'expliquer certains cas d'empreinte parentale.

### L'empreinte parentale : comment ça marche ?

La plupart des gènes sont exprimés à partir de chromosomes hérités de la mère et du père. Cependant, pour certains gènes, la copie héritée de l'un ou l'autre des parents est maintenue silencieuse. On dit que ces gènes sont soumis à un phénomène d'empreinte parentale. C'est le cas par exemple d'une série de gènes impliqués dans le contrôle de la croissance de l'embryon, dont *Igf2*. Les gènes soumis à empreinte sont souvent trouvés sur des segments contigus de chromosomes, suggérant un contrôle coordonné.

Il apparaît que, très souvent, l'empreinte est fondée sur une méthylation spécifique d'allèle des dinucléotides CpG au niveau de régions limitées, parfois situées à grande distance des gènes impliqués. Comme la méthylation de certaines portions du génome entraîne une répression de l'expression génique, un modèle de l'empreinte prédit que l'allèle hyperméthylé est réprimé tandis que l'allèle hypométhylé est exprimé. Cependant, l'analyse d'embryons homozygotes pour une délétion du gène codant pour l'ADN méthyltransférase *Dnmt1* a montré

que si la perte de la méthylation conduisait le plus souvent à l'activation de l'expression des gènes soumis à empreinte, dans certains cas, au contraire, elle pouvait soit induire une perte d'expression, soit n'avoir aucune influence, ce qui semblait exclure un schéma simple d'association méthylation/répression dans l'empreinte [1, 2]. De plus, alors qu'on pourrait s'attendre à ce que l'ensemble des gènes d'un segment donné soient exprimés uniquement à partir du chromosome paternel ou du chromosome maternel, il n'est pas rare de trouver un gène montrant une expression réciproque par rapport à la majorité des gènes du locus, c'est-à-dire exprimé uniquement à partir de l'allèle maternel quand les autres gènes le sont à partir de l'allèle paternel ou vice-versa. La découverte concomitante par plusieurs laboratoires d'éléments de régulation appelés « insulateurs », localisés entre des gènes soumis à empreinte parentale, offre une explication rationnelle à ces observations.

### Les « insulateurs » : éléments à part entière de la régulation de l'expression des gènes

La transcription des gènes est contrôlée par différentes séquences agissant en *cis*, c'est-à-dire portées par la même molécule d'ADN. Le promoteur assure l'amarrage de la machinerie de transcription au niveau du site où démarre la transcription. Des éléments de régulation à distance, les *enhancers* et les *silencers*, contrôlent l'activité des promoteurs tout en étant éloignés de plusieurs centaines de milliers de paires de base. Le champ d'action d'un *enhancer* ou d'un *silencer* peut être limité par des éléments que l'on appelle des « insulateurs ». Ces éléments ne modifient pas l'activité

propre des *enhancers* et des *silencers*, mais empêchent simplement leur communication avec les promoteurs (*figure 1A*). Chez la levure *S. cerevisiae* et chez la drosophile, les séquences amont de différents promoteurs sont elles-mêmes douées d'activité « insulateur » [3-6]. Les modèles proposant un mécanisme moléculaire d'action des « insulateurs » demeurent extrêmement spéculatifs, comme c'est aussi le cas pour les *enhancers*. En bref, les « insulateurs » pourraient empêcher la progression de protéines le long de la fibre nucléosomique, ou bien seraient responsables de modifications plus globales de la localisation et/ou de la structure tridimensionnelle de la chromatine dans le noyau [7]. Des mutations dans des « insulateurs » semblent être responsables de maladies génétiques. C'est, par exemple, le cas de différentes délétions dans un groupe de séquences répétées appelé Sxl, trouvées en amont du gène *Sry* (gène de détermination du sexe), qui sont associées à des phénotypes d'inversion du sexe [8]. Le gène *Sry*, isolé de ses séquences flanquantes, est particulièrement sensible aux effets de position, et les répétitions Sxl pourraient avoir une activité « insulateur » protégeant *Sry* d'un environnement répresseur. De façon similaire, la dystrophie facio-scapulohumérale est associée à la délétion d'un nombre variable d'unités répétées de 3,3 kb, dans la région subtélomérique 4q [9]. Bien qu'un gène codant pour une protéine à homéodomaine ait été identifié au sein de cette unité répétée [10, 11], on n'a pas d'évidence pour l'instant de son implication directe dans la maladie et différentes données suggèrent plutôt un effet à distance. On peut imaginer que ces répétitions en tandem comportant un promoteur soient douées d'activité de type insulateur. Leur

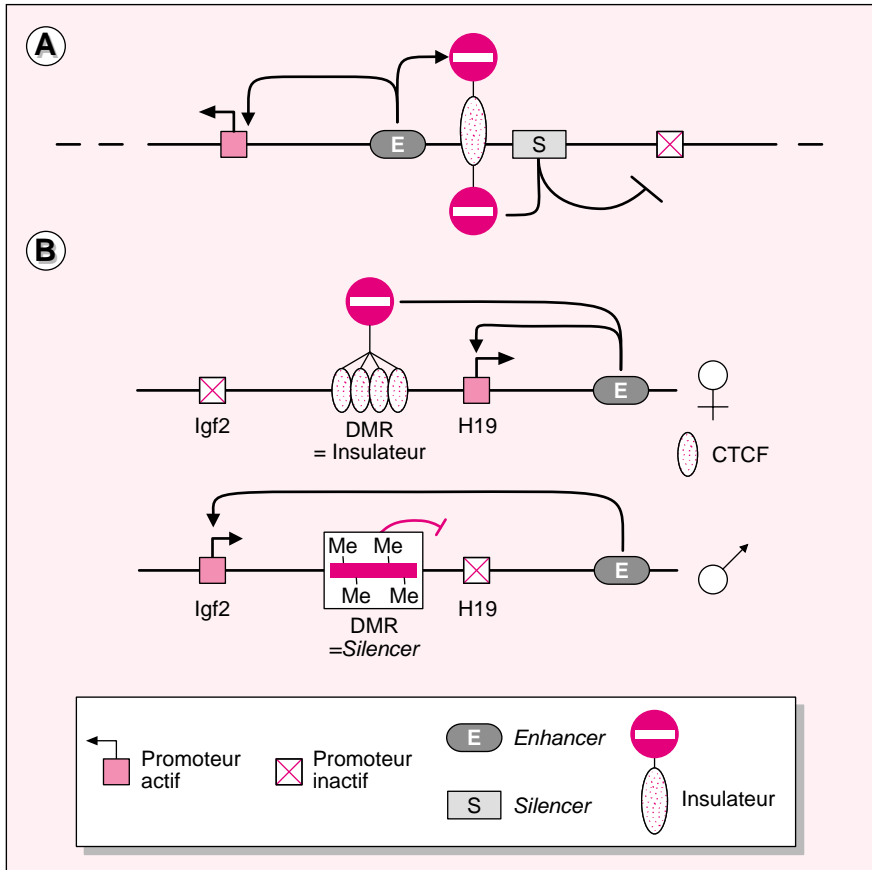


Figure 1. Exemples de fonctionnement d'un «insulateur». **A.** Éléments contrôlant l'expression des gènes en cis. Une flèche indique l'activation d'un promoteur par un enhancer, une barre son inactivation par un silencer. Un insulateur empêche la communication entre un promoteur et un enhancer ou un silencer, comme indiqué par le panneau de sens interdit. **B.** Un insulateur modulable dépendant de CTCF contrôle l'expression réciproque des gènes *Igf2* et *H19* en fonction de leur origine parentale. La méthylation de l'allèle paternel au niveau de la région DMR a deux fonctions. D'une part, elle induit des modifications épigénétiques, dont la méthylation, du promoteur *H19* ayant pour conséquence sa répression. D'autre part, elle empêche la fixation de CTCF, inactivant la fonction insulateur et permettant donc l'activation du promoteur *Igf2* par les enhancers situés en 3' du locus, représentés par un ovale. Les enhancers dirigeant l'expression dans des tissus dérivés de l'endoderme sont localisés à 7 et 9 kb en aval du gène *H19* et d'autres situés encore plus en aval permettent l'expression dans les tissus dérivés du mésoderme [14]. Ces enhancers sont à plus de 100kb du promoteur *Igf2*.

délétion pourrait donc affecter l'expression d'un gène distal, peut-être *Frg1*, situé à 100 kb.

Bien que des «insulateurs» aient été décrits pour la première fois il y a plus de dix ans, chez la drosophile, il a fallu attendre 1999 pour qu'une protéine impliquée de façon convaincante dans l'activité de différents «insulateurs» soit identifiée. Un élé-

ment «insulateur» délimite la frontière amont du locus  $\beta$ -globine et coïncide avec un site hypersensible aux nucléases. La dissection de cet «insulateur» a mis à jour un élément minimal de 42 pb, puis a conduit tout récemment à l'identification d'une protéine appelée CTCF (*CCCTC-binding factor*) se liant à l'élément minimal *via* un domaine conte-

nant onze doigts de zinc [12]. La protéine est très conservée chez les vertébrés et l'on trouve en fait des sites de liaison à CTCF dans un grand nombre d'«insulateurs» [13]. Un site unique CTCF suffit à conférer une activité de blocage de la communication *enhancer*/promoteur. Lorsque le site est réitéré, cette activité est fortement augmentée et CTCF pourrait coopérer avec d'autres protéines pour induire la pleine activité des «insulateurs» naturels [12, 13].

### DMR : une région différemment méthylée entre les gènes *Igf2* et *H19*

Les gènes *H19* et *Igf2* font partie d'un segment chromosomique soumis à empreinte parentale sur le chromosome 7 de la souris (synténique au segment de chromosome humain 11p15.5). *H19*, qui produit un ARN non-codant, est exprimé uniquement à partir du chromosome maternel tandis qu'*Igf2* est exprimé à partir du chromosome paternel. Les deux gènes partagent les mêmes *enhancers* (figure 1B) [14]. On trouve aussi à proximité de ces gènes une région qui montre une hyperméthylation des CpG uniquement sur le chromosome paternel. Elle a été appelée DMR (*differentially methylated region*) et apparaissait donc comme un bon candidat pour le contrôle réciproque des deux gènes, voire pour le contrôle du phénomène d'empreinte pour l'ensemble du locus (figure 1B). De fait, la délétion de DMR provoque la co-expression des gènes *Igf2* et *H19* à partir du chromosome qui la porte, c'est-à-dire la perte de la répression de l'allèle *Igf2* maternel et/ou de l'allèle *H19* paternel [13]. Tout un ensemble d'observations suggèrent en fait que DMR serait à la fois responsable de l'inactivation d'*H19* sur le chromosome paternel et de celle d'*Igf2* sur le chromosome maternel. L'état méthylé de la région DMR apparaît également critique, ce que démontre l'expression bi-allélique d'*H19* chez des embryons homozygotes pour la délétion de *dnmt1* [1]. Sur le chromosome paternel, la répression d'*H19* peut simplement s'expliquer par la proximité avec une

région DMR hyperméthylée qui agirait comme un *silencer*. En revanche, aucun modèle simple ne pouvait expliquer la répression d'*Igf2* par DMR sur le chromosome maternel. Comme les *enhancers* activant *Igf2* sont situés en aval d'*H19*, il avait été postulé l'existence d'un « insulateur », au sein de DMR, qui empêcherait sur le chromosome maternel l'utilisation de ces *enhancers* par *Igf2*. Cette hypothèse vient d'être confirmée par les travaux des laboratoires de S. Tilghman, G. Felsenfeld, R. Ohlsson, et K. Pfeifer, résumés ci-après.

### Connexions entre insulation, méthylation et empreinte

Quatre articles récemment publiés ont testé l'effet de fragments de DMR sur des couples promoteur/*enhancer* variés chez des souris transgéniques ou dans des expériences de transfection dans différentes lignées cellulaires d'origine somatique [14-17]. Tous ces articles montrent qu'effectivement DMR présente une activité « insulateur » en bloquant l'activation de promoteurs par différents *enhancers*, et ce uniquement lorsqu'il est interposé.

Il existe également une région DMR chez l'homme, à la position homologue entre *Igf2* et *H19*, et elle présente comme la région DMR de souris une activité « insulateur » [16]. La comparaison de ces séquences chez la souris, le rat, et l'homme met à jour des îlots conservés, au nombre de 4 chez la souris, 7 chez l'homme. Ceux-ci apparaissent de plus occupés par des protéines *in vivo*, et ce uniquement sur l'allèle maternel [18]. La séquence consensus qui se dégage ressemble très fortement aux sites CTCF retrouvés aux bornes du locus  $\beta$ -globine. De plus, des protéines CTCF sont liées à l'allèle maternel mais pas à l'allèle paternel de la DMR [19].

De façon tout à fait remarquable, CTCF n'est plus capable de lier *in vitro* les sites trouvés dans la région DMR lorsqu'ils sont au préalable méthylés au niveau des CpG. Le fait que CTCF n'est trouvé lié à la DMR *in vivo* que sur l'allèle maternel, qui n'est pas méthylé au contraire de l'allèle paternel, démontre une très

forte corrélation entre liaison de CTCF au niveau de la DMR, absence de méthylation, et non-expression d'*Igf2*. Ainsi, l'activité « insulateur » de la DMR serait abolie par sa méthylation. Il semble donc bien que l'empreinte imposée par la méthylation allèle-spécifique de DMR a pour conséquence de transformer cette région soit en *silencer*, soit en insulateur, assurant ainsi l'expression réciproque des gènes *Igf2* et *H19*.

### Implications pour les maladies humaines associées à une altération de l'empreinte parentale

Une perte de l'empreinte parentale des gènes du segment chromosomique humain 11p15.5, comprenant *Igf2* et *H19*, est impliquée dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). Cette maladie associe toute une série d'anomalies du développement comme un excédent de poids à la naissance, une organomégalie, une macroglossie et une prédisposition aux tumeurs embryonnaires, comme les tumeurs de Wilms. On observe fréquemment l'expression des deux allèles du gène *Igf2* chez les patients BWS ainsi que dans les tumeurs de Wilms en général [20]. Chez certains patients, il existe de plus une corrélation claire entre cette perte d'empreinte parentale et une augmentation de la méthylation de l'allèle maternel du gène *H19*, incluant les sites CTCF trouvés dans DMR. Ces maladies résultent donc en partie de l'inactivation de DMR. De plus, un gène impliqué dans les tumeurs de Wilms a été cartographié à la même position que le gène codant pour la protéine CTCF, suggérant un lien entre « insulateur » et cancer. Il est à noter que chez d'autres patients, l'expression biallélique de *Igf2* pourrait impliquer la perte de *silencers* spécifiques du gène *Igf2*, actifs normalement sur l'allèle maternel et uniquement dans les tissus dérivés du mésoderme [21]. Ce second mécanisme semble indépendant du gène *H19* et de la région DMR.

Outre le syndrome de Beckwith-Wiedemann, on connaît actuellement une dizaine de maladies génétiques humaines associées à une altération

de l'empreinte parentale, comme le syndrome de Prader-Willi. La caractérisation d'éléments de régulation de l'expression génétique pouvant agir à distance, comme des « insulateurs » et des *silencers*, est certainement un des prochains défis à relever dans l'étude de ces maladies ■

### Remerciements

Les recherches dans le laboratoire d'Éric Gilson sont soutenues par la Ligue nationale contre le cancer.

### RÉFÉRENCES

1. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-5.
2. Caspary T, Cleary MA, Baker CC, Guan XJ, Tilghman SM. Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3466-74.
3. Bi X, Broach JR. UASrpg can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev* 1999; 13: 1089-101.
4. Sekinger EA, Gross DS. SIR repression of a yeast heat shock gene: UAS and TATA footprints persist within heterochromatin. *EMBO J* 1999; 18: 7041-55.
5. Ohtsuki S, Levine M. GAGA mediates the *enhancer* blocking activity of the *eve* promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1998; 12: 3325-30.
6. Fourel G, Revardel E, Koering CE, Gilson E. Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J* 1999; 18: 2522-37.
7. Bulger M, Groudine M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 1999; 13: 2465-77.
8. Capel B, Rasberry C, Dyson J, et al. Deletion of Y chromosome sequences located outside the testis determining region can cause XY female sex reversal. *Nat Genet* 1993; 5: 301-7.
9. van Deutekom JC, Wijmenga C, van Tienhoven EA, et al. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2037-42.
10. Ding H, Beckers MC, Plaisance S, Marynen P, Collen D, Belayev A. Characterization of a double homeodomain protein (DUX1) encoded by a cDNA homologous to 3.3 kb dispersed repeated elements. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1681-94.

## RÉFÉRENCES

11. Gabriels J, Beckers MC, Ding H, *et al*. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene* 1999; 236: 25-32.
12. Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the *enhancer* blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 1999; 98: 387-96.
13. Saitoh N, Bell AC, Recillas-Targa F, *et al*. Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken  $\beta$ -globin domain. *EMBO J* 2000; 19: 2315-22.
14. Kaffer CR, Park K-Y, Ives E, *et al*. A transcriptional insulator at the imprinted *H19/Igf2* locus. *Genes Dev* 2000; 14: 1908-19.
15. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 2000; 405: 482-5.
16. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive *enhancer*-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature* 2000; 405: 486-9.
17. Kanduri C, Holmgren C, Pilartz M, *et al*. The 5' flank of mouse H19 in an unusual chromatin conformation unidirectionally blocks *enhancer*-promoter communication. *Curr Biol* 2000; 10: 449-57.
18. Szabo PE, Tang S-HE, Rentsendorj A, Pfeifer GP, Mann JR. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 2000; 10: 607-10.
19. Kanduri C, Pant V, Loukinov D, *et al*. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol* 2000; 10: 853-6.
20. Weksberg R, Shen DR, Fei YL, Song QL, Squire J. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 1993; 5: 143-50.
21. Constanica M, Dean W, Lopes S, Moore T, Kelsey G, Reik W. Deletion of a *silencer* element in *Igf2* results in loss of imprinting independent of *H19*. *Nat Genet* 2000; 26: 203-6.

**Geneviève Fourel**  
**Éric Gilson**

*Équipe « Biochimie et génétique des télomères », Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Cnrs UMR 5665, École normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.*

TIRÉS À PART

E. Gilson.

**COBIP**

r