

L'effet de position : influence de la conformation chromatinienne sur l'expression des gènes eucaryotes

Marie-Odile Fauvarque

Société Française de Génétique

Président

A. Nicolas

Président d'honneur

F. Jacob

Vice-présidents

R. Berger

H. Pinon

C. Stoll

Secrétaire général

M. Solignac

Trésorier

P.-M. Sinet

Prière d'adresser toute correspondance au Secrétariat général de la SFG, Michel Solignac, laboratoire de biologie et génétique évolutives, bâtiment 13, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Comité de rédaction

A. Bernheim

M. Bolotin-Fukuhara

M. Fellous

J. Géniermont

B. Michel

R. Motta

A. Nicolas

S. Sommer

P. Thuriaux

D. de Vienne

Secrétaire

M.-L. Prunier

L'expression d'une séquence codante d'ADN dépend de séquences en *cis* appelées séquences *cis*-régulatrices. Ces séquences dirigent quand et comment chaque gène s'exprime dans l'organisme. Un transgène intégré artificiellement dans un génome peut ainsi subir l'influence de séquences *cis*-régulatrices endogènes en fonction de sa position dans le génome. Ce phénomène a été mis à profit pour rechercher des familles de *enhancers* capables de diriger l'expression d'un gène rapporteur contenu dans un transgène, et possédant des spécificités cellulaires, tissulaires ou développementales définies [1].

Par ailleurs, on peut observer l'extinction mosaïque de gènes lorsqu'ils sont déplacés de leur contexte chromatinienn initial. Il s'agit d'un autre type d'effet de position qui reflète l'influence (épigénétique) de la structure chromatinienne globale de la région dans laquelle le gène est délocalisé, indépendamment de l'information donnée par ses propres séquences *cis*-régulatrices. L'inactivation génique qui s'ensuit provoque un phénomène connu sous le nom de variéation* par effet de position. Enfin, le changement de position d'un allèle par rapport à son homologue peut parfois perturber l'expression d'un gène. Il s'agit là d'un effet de position relatif, connu sous le nom de transvection chez la drosophile. La variéation et la transvection sont des phénomènes qui offrent la possibilité d'étudier des mécanismes de régulation, largement répandus dans les génomes eucaryotes, faisant interve-

nir le contexte chromatinienn (l'hétérochromatine par opposition à l'euchromatine) ou l'interaction en *trans* des allèles homologues.

La variéation par effet de position chez la drosophile

L'étude cytologique du génome met en évidence deux formes principales de chromatine, l'euchromatine et l'hétérochromatine, qui se situent dans des domaines distincts du noyau cellulaire. Sur les chromosomes polytènes** de drosophile, l'euchromatine forme des bandes distinctes au niveau des bras chromosomiques, tandis que l'hétérochromatine, qui se situe essentiellement dans les régions péricentriques et télomériques des chromosomes, a un aspect diffus. L'euchromatine est essentiellement constituée de séquences uniques et contient la plupart des gènes actifs du génome. L'hétérochromatine est, au contraire, riche en séquences moyennement et très répétées, et rares sont les gènes identifiés dans cette structure. Enfin, l'hétérochromatine reste condensée au cours du cycle cellulaire et est sous-répliquée. En 1930, Müller [2] décrit un phénotype d'expression mosaïque du gène *white*** de drosophile. Certaines cellules de l'œil expriment le gène tandis que d'autres cellules aparais-

* Terme anglais utilisé ici dans l'expression « Variéation par Effet de Position » qui est une traduction de Position Effect Variegation, et qui désigne un aspect panaché ou mosaïque.

** Chromosomes géants résultant d'endoréplication sans ségrégation des chromatides, et composés de ce fait d'un nombre élevé de chromatides associées entre elles.

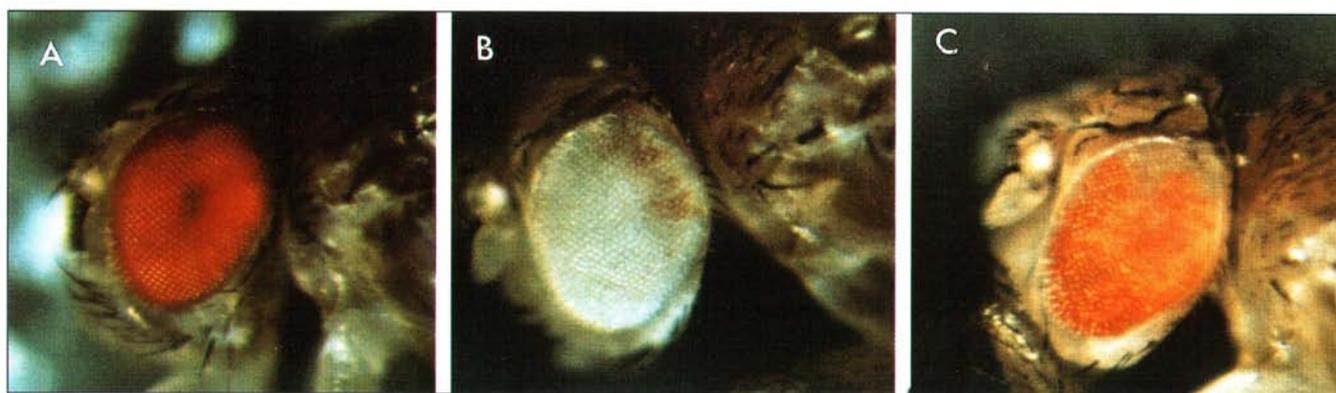


Figure 1. **Variégation par effet de position.** A : œil sauvage, B,C : Expression mosaïque du gène *white* délocalisé au voisinage de l'hétérochromatine centromérique. A 18 degrés (B), l'extinction génique est plus fréquente qu'à 25 degrés (C).

sent incapables de produire la fonction *w^r*. Comme le produit du gène *white* ne diffuse pas d'une cellule à l'autre, le mélange de tissus sauvages et mutants se visualise par des zones oculaires rouges et blanches (figure 1). La panachure observée est toujours corrélée à la présence d'hétérochromatine au voisinage du gène euchromatinien *w^r*, à la suite des réarrangements chromosomiques [3] (figure 2A). La séquence codante du gène est intacte puisque ce phénotype peut être rétabli par une nouvelle translocation relocalisant le gène *white* dans son contexte euchromatinien normal. Il s'agit donc bien d'un effet de position et non d'une détérioration de la séquence nucléotidique du gène [4-6]. L'impact de cette nouvelle jonction euchromatine-hétérochromatine se manifeste parfois sur des gènes euchromatiniens à plusieurs kilobases de distance, suggérant une propagation de l'hétérochromatine le long du chromosome. Sur les chromosomes polytènes, la région affectée prend d'ailleurs un aspect cytologique semblable à celui de l'hétérochromatine. Ainsi, la variégation par effet de position a été communément interprétée comme le résultat de l'extension polaire de l'hétérochromatine cen-

tromérique sur les bras chromosomiques. C'est cette structure hétérochromatinienne qui inhiberait la transcription, et cela de façon stable, parce qu'elle se transmet aux cellules filles selon un mode clonal. Cette hypothèse reste encore la plus probable au vu des propriétés génétiques et physiologiques de la variégation, mais d'autres mécanismes ont été proposés pour certains cas particuliers d'extinction mosaïque de gènes. Par exemple, la variégation du gène *yellow* – un marqueur pigmentaire de la cuticule – est associée à une nette réduction de la polyténie au niveau de ce locus dans les glandes salivaires. De ce fait, il a été proposé que l'extinction génique résulterait d'une perte allélique irréversible qui pourrait se produire au cours des divisions cellulaires, soit par l'excision somatique d'un segment d'ADN, soit à la suite d'une sous-réplication du locus [7]. Bien que marginale, la perte allélique due à la juxtaposition d'hétérochromatine constitue donc une alternative possible à l'inactivation épigénétique de gène. L'existence de cas non conformes au modèle général décrit ci-dessous met en garde contre un système modèle trop schématique pour expliquer les différents cas de variégation par effet de position.

Modificateurs génétiques de la variégation et modèle expansionniste

La variégation par effet de position est sensible à des mutations domi-

nantes « Suppresseur » et « Enhancer de Variégation » (*Su(var)* et *E(var)*) qui, respectivement, diminuent et augmentent le nombre de cellules dans lesquelles le gène est éteint [4]. Remarquons que (dans le cas général) le produit sauvage d'un gène *Su(var)* participe à la formation d'hétérochromatine puisqu'une mutation *Su(var)*, qui entraîne une perte de fonction, empêche l'inactivation génique. Par exemple, le gène *Su(var)205* code pour une protéine constitutive de l'hétérochromatine (HP-1) et le gène *Su(var)(3)7* code pour une protéine à doigt de zinc qui pourrait se fixer directement à l'ADN. Les protéines codées par les gènes *Su(var)* sont donc susceptibles d'intervenir physiquement dans la formation d'hétérochromatine. Au contraire, les protéines codées par les gènes *E(var)* contribuent à la déstabilisation de l'hétérochromatine. De façon remarquable, certains *Su(var)* et *E(var)* présentent des effets de dose qui se traduisent par un effet opposé sur la variégation selon que le gène est présent en un exemplaire ou en trois. Le gène *Su(var)205* est, par exemple, un haplo-suppresseur/triplo-enhancer de l'inactivation mosaïque de gène. L'identification génétique de ce type de modificateur a permis de proposer un modèle expansionniste de variégation. Selon ce modèle, l'inactivation résulterait de l'extension de complexes multimériques hétérochromatiniens le long de la fibre chromatinienne, qui se polymérisent selon une loi

*** Par habitude, en génétique de la drosophile, les gènes sont désignés par le phénotype que leur mutation provoque. Ainsi le mutant *white1* possède des yeux blancs tandis que la mouche sauvage a des yeux rouges vermillon, et le gène correspondant est appelé *white* (abrégié *w*).

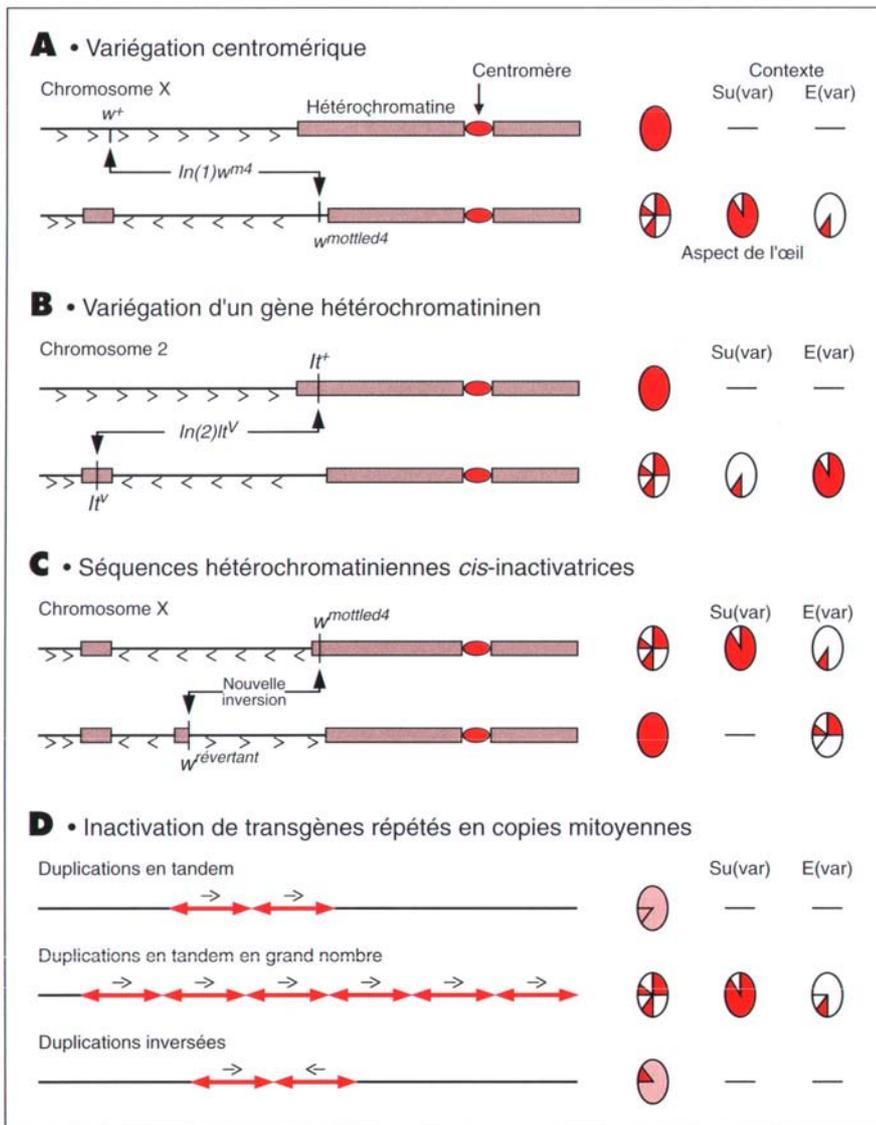


Figure 2. **Différentes origines pour la variéation.** A: Inactivation mosaïque du gène *white* lorsqu'il est déplacé au voisinage de l'hétérochromatine centromérique (allèle w^{M4}). L'inactivation est sensible aux mutations $Su(var)$ et $E(var)$. B: Variéation inverse: l'expression du gène *light* nécessite un contexte hétérochromatinien. Les mutations $Su(var)$ et $E(var)$ agissent de façon inverse sur l'inactivation de l'allèle lt^V . C: Réversion de l'allèle w^{M4} par une nouvelle translocation qui replace le gène *white* dans un contexte euchromatinien. Cependant, dans certains cas, la translocation apporte quelques séquences hétérochromatiniennes qui restent associées au locus. Si bien que dans un contexte $E(var)$ fort, ces séquences suffisent à l'inactivation mosaïque du gène. Il est probable que ces séquences permettent la formation locale d'hétérochromatine car l'inactivation est sensible aux modificateurs de la variéation centromérique. D: Les répétitions inversées ou en tandem d'un transgène provoquent l'inactivation mosaïque du gène marqueur w^+ contenu dans ces transgènes. Cette inactivation n'est sensible aux modificateurs de la variéation qu'à partir d'un nombre important de copies (4 et plus). Cette expérience met en évidence la relation hétérochromatine-séquences répétées et suggère que la formation d'hétérochromatine aux télomères et aux centromères se fait à cause de l'existence de séquences répétées dans ces régions.

d'action de masse [8] (figure 3). Ces complexes multimériques inactive- raient les gènes euchromatiques en rendant l'ADN inaccessible à leurs facteurs de transcription. Dans une situation normale, des barrières empêchent la propagation de l'hétérochromatine au-delà de limites pré- établies. Si une cassure chromoso- mique (inversion, translocation, délétion) détruit la jonction euchro- matine-hétérochromatine, l'expansion de l'hétérochromatine centromé- rique n'est plus arrêtée, et se fait de manière plus ou moins stochas- tique selon la concentration des constituants dans les cellules, c'est-à- dire selon la dose des produits de $Su(var)$ et de $E(var)$.

Le chromosome Y est essentiellement hétérochromatinien et agit de façon analogue sur la variéation. En effet, la présence d'un chromosome Y chez des femelles XXY empêche l'inacti- vation par effet de position, probable- ment parce que les composants bio- chimiques de l'hétérochromatine sont tirés par le chromosome Y supplé- mentaire. Réciproquement, l'absence du chromosome Y chez des mâles XO augmente le nombre de cellules dans lesquelles un gène soumis à un effet de position est éteint.

Le nombre de $Su(var)$ et $E(var)$ génétiquement identifiés va croissant (plus de 120 dont une majorité de $Su(var)$) mais peu d'entre eux sont caractérisés sur le plan moléculaire. Outre des constituants directs de l'hétérochromatine, on trouve aussi des enzymes susceptibles de faire mûrir les produits de ces complexes multimériques (phosphatase) et, potentiellement, des enzymes pou- vant catalyser la réaction de polymé- risation le long de la fibre chromati- nienne.

Les nucléosomes interviennent sans doute directement dans l'expansion d'une structure inactive de la chro- matine car l'extinction mosaïque des gènes affectés dépend de la présence des gènes codant pour les histones. De plus, l'inactivation génique est également diminuée par le butyrate de sodium, un inhibiteur de la désa- cétylation des histones, suggérant que les histones, sous leur forme désacétylée, prennent part à la for-

mation des complexes hétérochromatiniens.

La variégation est extrêmement sensible aux changements de température. A 28 °C, l'extinction génique est presque totalement abolie comparée au phénotype très fort observé à 18 °C (figure 1). Cet effet pourrait refléter l'effet de la température sur la réaction chimique d'assemblage des protéines de l'hétérochromatine entre elles et avec l'ADN, ou encore son effet sur la transcription des gènes *Su(var)* et *E(var)*.

Existe-t-il réellement des séquences barrières capables d'arrêter la propagation hétérochromatinienne? Certaines séquences placées en *cis*, comme les séquences *scs* et *scs'* du gène *hsp70*, permettent d'affranchir un transgène des effets de position euchromatiniens [9]. De ce fait, elles sont supposées séparer le génome en domaines discrets et indépendants pour leur activité transcriptionnelle [10, 11]. Les séquences *scs* et *scs'* ne sont pas, pour autant, capables de protéger de la variégation par effet de position [10]. La seule séquence connue qui protège un gène rapporteur de l'extinction mosaïque par effet de position est un fragment de 430 paires de bases du rétrotransposon *gypsy* [12]. Le produit du gène *mod(mdg4)* intervient dans l'arrêt directionnel de la propagation de complexes inactivateurs au niveau de ce fragment [13]. Le produit sauvage du gène doit aussi empêcher la propagation hétérochromatinienne depuis les centromères vers les bras chromosomiques puisque les mutations de *mod(mdg4)* augmentent la variégation par effet de position observée au centromère. Le rôle du produit *Mod(mdg4)* sur le fragment de *gypsy*, suggère que ce produit reconnaît des séquences qui formeraient des barrières physiques à l'extension de l'hétérochromatine centromérique ou télomérique le long des bras chromosomiques (figure 3).

Autres cas de variégation, autre modèle

L'hétérochromatine centromérique n'est pas la seule structure hétéro-

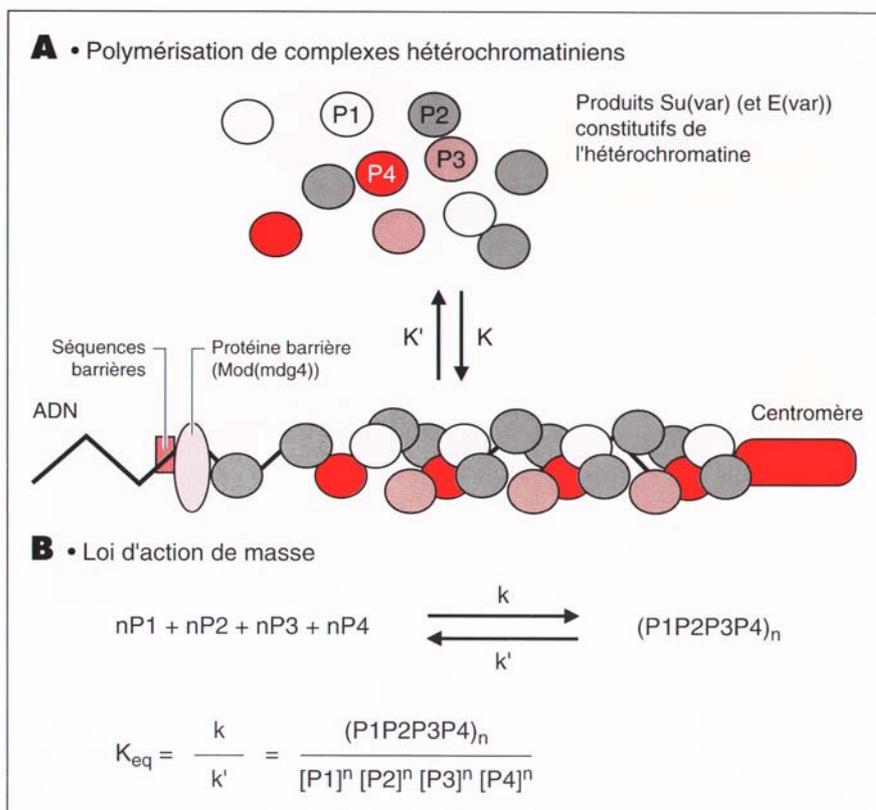


Figure 3. **Modèle « expansionniste ».** A : L'inactivation génique par effet de position serait la conséquence de l'expansion de l'hétérochromatine centromérique le long des bras chromosomiques. B : Cette expansion dépend de la polymérisation de complexes hétérochromatiniens s'assemblant selon une réaction chimique obéissant à la loi d'action de masse. Ainsi, la réaction peut être déplacée dans un sens ou dans l'autre en changeant la concentration d'un seul des produits qui composent le polymère. Normalement, l'expansion de l'hétérochromatine est bloquée par une séquence barrière, mais si cette barrière est détruite, alors elle peut s'étendre sur les bras chromosomiques en fonction de la concentration des constituants dans la cellule. Si la concentration d'un produit constitutif de l'hétérochromatine est limitante, la formation des complexes est réduite et il n'y a plus, ou peu, de formation d'hétérochromatine au niveau du gène w^+ : l'œil redevient presque entièrement rouge. Réciproquement l'augmentation d'un seul de ces produits suffit à déplacer la réaction vers la formation d'un plus grand nombre de complexes protéiques et leur association à l'ADN propage alors l'hétérochromatine sur une plus grande distance, englobant le gène w^+ : l'œil devient presque blanc, la variégation (c'est-à-dire l'inactivation) est augmentée.

chromatinienne responsable de la répression épigénétique de gènes euchromatiniens. Chez la drosophile, la variégation du gène marqueur w^+ , contenu dans un transgène, est aussi le résultat d'insertions dans le voisinage des télomères et dans les chromosomes 4 et Y qui sont essentiellement hétérochromatiniens. Cela indique une relation stricte entre ce type d'inactivation stochastique et la

présence de blocs hétérochromatiniens [14]. Bien que les transgènes insérés au voisinage des télomères montrent un phénotype semblable à celui des transgènes insérés au voisinage de l'hétérochromatine centromérique, les mutations *Su(var)* et *E(var)* sont en majorité sans effet sur la variégation télomérique. Ainsi, les produits impliqués dans la formation d'hétérochromatine télomérique ou

centromérique doivent être en grande partie différents.

L'hétérochromatine n'a pas toujours un effet négatif sur la transcription. L'expression des gènes hétérochromatiniens montre en effet une dépendance inverse de celle des gènes euchromatiniens vis-à-vis de leur environnement chromosomique. Le gène *light* est normalement localisé dans l'hétérochromatine centromérique. Or, sa translocation dans un contexte euchromatinien provoque exactement le même type d'extinction génique que celle observée au centromère pour les gènes euchromatiniens (*figure 2B*). L'extinction est d'autant plus fréquente que le réarrangement éloigne le gène *light* du centromère. Les modificateurs génétiques de la variéation centromérique agissent également sur la variéation du gène *light* mais de façon inverse pour la plupart. Par exemple, la mutation *Su(var)205* ou la présence d'un chromosome Y supplémentaire augmentent le nombre de cellules dans lesquelles le gène *light* est éteint [4]. Tout se passe comme si l'expression des gènes hétérochromatiniens dépendait de facteurs spécifiques de l'hétérochromatine et *vice versa*.

Cette « variéation inverse » de gènes hétérochromatiniens pourrait résulter de la déstabilisation de complexes multimériques en absence d'un pôle de polymérisation – ici le centromère –, déstabilisation d'autant plus forte que le gène se trouve éloigné de ce pôle. Dans cette hypothèse, les complexes hétérochromatiniens ont un rôle important pour permettre l'expression du gène *light*, peut-être parce qu'ils recrutent des facteurs de transcription spécifiques des gènes hétérochromatiniens, ou parce qu'ils rapprochent des séquences *cis*-régulatrices éloignées sur la séquence nucléotidique linéaire. L'extinction de gène, aussi bien dans le cas de la variéation que de la variéation inverse, pourrait donc s'interpréter comme résultant de l'expansion d'une structure chromatinienne qualitativement non adéquate pour la transcription du gène délocalisé.

D'autres auteurs préfèrent expliquer l'extinction mosaïque de gène par l'existence d'une compartimentalisa-

tion nucléaire. Chaque compartiment (télomérique, centromérique, euchromatinien, etc.) posséderait des facteurs de transcription spécifiques non accessibles aux autres compartiments. Le déplacement d'un gène dans un compartiment différent du sien provoquerait une inactivation génique par défaut des facteurs de transcription nécessaires à son activation [15]. Dans sa version la plus simple, ce modèle explique mal les effets de dose des produits *Su(var)* et *E(var)* qui s'observent aussi bien sur la variéation que sur la variéation inverse, suggérant que ces produits sont présents et accessibles aussi bien dans les domaines hétérochromatiniens que euchromatiniens. De même, les modulations de l'inactivation génique par des facteurs physiologiques externes, en particulier par le butyrate de sodium qui agit sur l'acétylation des histones, plaident en faveur d'un état dynamique de la chromatine qui peut intrinsèquement contrôler l'expression des gènes, plutôt que de l'existence de barrières imperméables statiques et extrinsèques aux chromosomes.

Que l'état chromatinien ait un rôle en lui-même sur l'expression des gènes n'exclut pas pour autant que l'organisation structurale du noyau ait son importance sur la régulation des gènes. Le noyau montre clairement une organisation en domaines euchromatiniens ou bien hétérochromatiniens et l'on peut supposer que le regroupement des régions hétérochromatiniennes entre elles (les centromères au chromocentre, et les télomères avec la membrane nucléaire) participe à la formation de domaines nucléaires qui permettent de stabiliser ces structures chromatinienes. Dans cette optique, l'organisation structurale du noyau peut effectivement intervenir dans la variéation par effet de position, mais de façon secondaire, en stabilisant une structure hétérochromatinienne à un *locus* donné. En effet, l'assemblage des régions hétérochromatiniennes peut entraîner la délocalisation d'un gène d'une région à l'autre du noyau consécutivement à un changement local dans son environnement chromatinien, comme on

l'a montré par exemple pour l'allèle *brown* ^{Dominant} qui se trouve délocalisé dans la région du chromocentre (voir ci-dessous). Dans ce cas, la position dans le noyau du *locus* affecté intervient sur sa variéation sans pour autant faire appel à des barrières imperméables entre les domaines nucléaires.

Séquences *cis*-inactivatrices

Quelles sont les séquences *cis* qui permettent la formation d'une structure hétérochromatinienne responsable de l'extinction des gènes euchromatiniens? On aurait pu penser que la structure globale du télomère ou du centromère fût absolument requise comme point de départ pour induire la variéation d'un gène euchromatinien. Or, un fragment de séquences hétérochromatiniennes (par exemple des séquences satellites répétées) peut suffire à induire la variéation d'un gène adjacent, dans un contexte par ailleurs totalement euchromatinien. Il a été mentionné ci-dessus que la variéation par effet de position peut être abolie si l'on rétablit le gène *white* dans son contexte euchromatinien de départ, grâce à un nouveau réarrangement chromosomique. Pourtant, dans certaines de ces souches révertantes, la variéation peut réapparaître en contexte *E(var)* si des séquences hétérochromatiniennes ont été drainées avec le *locus white* [4] (*figure 2C*).

D'autre part, la répétition en multiples copies mitoyennes d'un transgène, au sein de l'euchromatine, peut provoquer la variéation du gène rapporteur *w⁺* contenu dans ces transgènes [16] (*figure 2D*). La variéation observée est identique sur le plan phénotypique à l'effet de position, et est pareillement sensible aux mutations *Su(var)* et *E(var)*.

Les séquences répétées pourraient donc agir comme pôle de polymérisation pour la formation d'hétérochromatine locale dans une région euchromatinienne. La question se pose pourtant de savoir si la présence de séquences répétées dans l'euchromatine est suffisante pour induire une expansion locale d'hétérochromatine.

matine et l'inactivation de gènes, ou si la position de ces séquences par rapport aux régions hétérochromatiniennes joue également un rôle essentiel [16]. Ces travaux ont toutefois permis pour la première fois de proposer que les séquences moyennement et très répétées seraient activement impliquées dans la formation d'hétérochromatine autour des centromères ou dans les télomères.

Variégation chez la levure

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes délocalisés dans les télomères, les centromères ou dans les *loci* inactivés du type sexuel (*HML* et *HMR*), subissent une inactivation génique de nature stochastique et clonale, comparable à la variégation par effet de position chez la drosophile [17-20]. La mutation *ade2* provoque une coloration rouge des colonies due à l'accumulation du précurseur de l'adénine que les mutants sont incapables de synthétiser. Une insertion télomérique du gène sauvage *ADE2* peut subir une inactivation stochastique et stable qui se traduit par l'apparition de secteurs rouges au sein des colonies normalement blanches. L'inactivation télomérique dépend de produits (*SIR3*, *SIR4*, *Rap1*...) dont l'absence empêche l'extinction du gène délocalisé. Les mutations des gènes *SIR3* et *SIR4*, dont les produits sont présents à la périphérie du noyau, provoquent à la fois la dissociation des télomères de la membrane nucléaire et une perte de l'extinction génique, suggérant que la localisation nucléaire joue aussi un rôle dans le processus d'inactivation génique. Les événements moléculaires de l'inactivation télomérique sont en grande partie élucidés chez la levure. Brièvement, la protéine *RAP1* se lie aux séquences répétées des télomères et elle interagit directement avec les produits *SIR3* et *SIR4*. La répression transcriptionnelle serait ensuite le résultat de la propagation directionnelle de complexes inhibiteurs le long de la fibre chromosomique, faisant intervenir des interactions directes entre les produits *SIR* et les histones, en particulier l'histone *H4* sous sa forme désacétylée [18] (figure 4A).

La proximité artificielle d'hétérochromatine centromérique chez *Schizosaccharomyces pombe* induit également la variégation de gènes euchromatiniens [20]. Cependant, si certains constituants sont communs, les produits *RAP1*, *SIR2* et *SIR3* ne sont pas présents aux centromères, ce qui indique, comme chez la drosophile, une différence de constitution biochimique de l'hétérochromatine des centromères et des télomères.

Le génome de la levure possède trois copies des gènes du type sexuel dont seul un est actif et confère son identité sexuelle à la cellule (a ou alpha), tandis que les deux autres copies (l'une a, l'autre alpha) sont inactivées de façon stable. C'est la position de chacune de ces copies qui détermine son état d'activité: un même gène sera actif s'il est présent au *locus MAT*, et inactif s'il est présent dans l'un ou l'autre des deux *loci* inactivés *HML* ou *HMR*. Cet effet de position se produit donc dans des circonstances naturelles et il est nécessaire à la détermination cellulaire, à l'opposé de tous les exemples précédents qui résultent de réarrangements chromosomiques ou de manipulations génétiques. De plus, des éléments *cis*-inactivateurs ont pu être identifiés de part et d'autre de chacun des *loci HML* et *HMR*. Ces éléments contiennent, notamment, une séquence autonome pour la réplication (*ARS*) et des sites de liaison de la protéine *RAP1*. Un grand nombre des produits impliqués dans l'inactivation des gènes *HML* et *HMR* sont communs avec ceux des télomères; les mécanismes de l'extinction génique aux télomères et aux *loci* du type sexuel seraient donc similaires (figure 4B).

L'extinction mosaïque de gène est associée à une modification de l'espacement des nucléosomes au niveau du gène inactivé [14, 17]. L'ADN devient réfractaire à un certain nombre d'enzymes qui ont *in vivo* l'ADN pour substrat, en particulier la méthyltransférase. Cela reflète un changement de structure chromatinienne qui permet probablement de soustraire l'ADN aux activateurs transcriptionnels.

Généralisation à d'autres eucaryotes

La variégation par effet de position est bien caractérisée chez la drosophile et la levure et résulte de processus similaires. La présence de complexes inhibiteurs («hétérochromatiniens») sur la fibre chromatinienne provoque une inactivation génique aléatoire et durable, indépendante des gènes concernés. Qu'en est-il des autres eucaryotes? L'organisation du génome en domaine chromatinien actifs et inactifs est sans aucun doute conservée chez la plupart des eucaryotes. On observe, en effet, des phé-

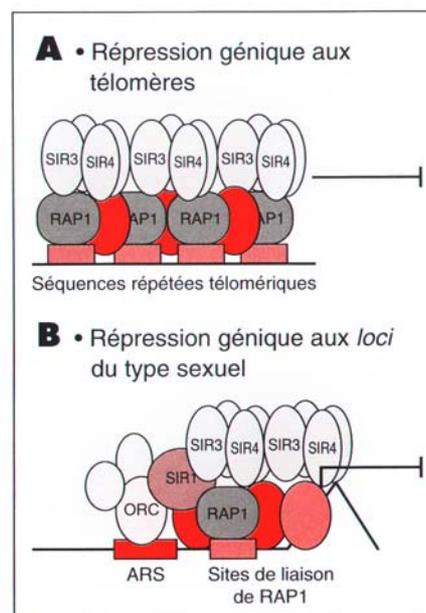


Figure 4. **Mécanismes moléculaires de la répression télomérique et aux loci du type sexuel chez la levure.** **A:** La protéine *RAP1* reconnaît des motifs répétés dans les séquences télomériques. Les protéines *SIR3* et *SIR4* permettent l'association des télomères à la membrane nucléaire et la répression transcriptionnelle des gènes inclus dans cette structure. **B:** L'inactivation des loci *HML* et *HMR* dépend non seulement de la fixation de la protéine *RAP1* mais aussi de la fixation du complexe *ORC* (complexe de mise en route de la réplication) sur les séquences autonomes pour la réplication *ARS*, à l'origine de la réplication. Les produits *SIR1,3,4* propagent la répression transcriptionnelle à partir de ces éléments en *cis*.

nomènes semblables d'extinction de gènes dans différents organismes. De plus, la conservation évolutive des protéines chromatinienne, par exemple du chromodomaine présent dans HP-1, vient à l'appui de cette idée [21]. Chez les plantes, la variéation est très étudiée sur des transgènes occasionnellement inactivés. Par exemple, dans les tissus floraux du pétunia, la répression du gène *AI* qui code pour la dihydroflavonol réductase, une enzyme du métabolisme des anthocyanines, entraîne une décoloration locale des pétales facilement repérable [22, 23]. L'inactivation génique chez les plantes, de même que chez les mammifères, est souvent corrélée à une hyperméthylation du *locus* inactivé. De ce fait, l'intégration d'un transgène dans une région hyperméthylée peut mener à une inactivation par effet de position, et donc à un phénotype de variéation sur les pétales [24]. Il n'a pas été prouvé que l'hyperméthylation est la cause primaire de l'inactivation et, comme ces régions semblent également subir des changements dans leur structure chromatinienne, la répression génique pourrait résulter aussi de la présence de complexes hétérochromatiniens au site d'intégration. Certains transgènes montrent, chez la souris, une expression mosaïque qui est parfois associée à un changement de l'état chromatinien au voisinage du transgène ([25] et références incluses). L'influence la plus remarquable du contexte chromosomique est certainement celle du chromosome X inactivé. Chez la femelle des mammifères, l'un des deux chromosomes X est inactivé au hasard au cours du développement embryonnaire, ce qui est la condition de la compensation de dose génique entre les individus mâles et femelles. L'inactivation est associée à l'hétérochromatini- sation complète du chromosome. Des gènes autosomiques artificiellement déplacés dans le chromosome X inactivé sont éteints de façon stable. Cela provoque un phénotype d'expression mosaïque chez des femelles qui ne possèdent qu'un allèle sauvage d'un marqueur pigmentaire autosomique, transloqué sur le chromosome X [26]. En effet, chez ces femelles, les cellules

dans lesquelles le chromosome X inactivé est celui qui porte le marqueur sont dépigmentées. L'épiderme panaché qui en résulte possède les mêmes propriétés phénotypiques que celles de la variéation par effet de position; l'extinction génique apparaît de façon aléatoire et se transmet de façon clonale. Cet exemple montre que les propriétés caractéristiques de l'hétérochromatine sont aussi retrouvées chez les mammifères: c'est une structure chromatinienne qui inactive de façon permanente les gènes normalement situés dans l'euchromatine.

Interactions chromosomiques en *trans*

L'interaction fonctionnelle entre allèles homologues a été mise en évidence depuis longtemps chez la drosophile et décrite sous le terme de transvection par E.B. Lewis [27, 28]. Pour certaines mutations, le phénotype des hétérozygotes est modifié si un réarrangement chromosomique éloigne l'allèle mutant de son homologue sauvage. La transvection est donc un effet de position relatif d'un allèle par rapport à son homologue. Des facteurs de transcription pourraient exister, capables de communiquer en *trans* une information à l'allèle homologue, et de compenser ainsi une mutation en *cis*, ou, au contraire, de l'amplifier. Le produit du gène *zeste* (*z*) est capable de se lier directement à l'ADN et de former des agrégats par polymérisation. *Zeste* est responsable de la transvection à un bon nombre de *loci*, dont le gène homéotique *Ultrabithorax* et le gène *white*. Le produit néomorphe* de l'allèle *z^l* provoque, par exemple, une répression du gène *white* si, et seulement si, les allèles de *w^r* sont appariés ou proches l'un de l'autre [29]. Cette répression est de type mosaïque, suggérant qu'elle peut impliquer la présence de complexes inhibiteurs changeant la structure de la chromatine. Comme les mutations nulles de perte de fonction de *zeste* se comportent comme des *enhancers* récessifs de la variéation par effet de position, la fonction normale de *Zeste* pourrait être de déstabiliser ces complexes et d'ouvrir la chromatine pour faciliter la transcription [30].

En général, la variéation par effet de position est récessive; c'est-à-dire que si un seul des allèles est juxtaposé à un bloc hétérochromatinien, l'expression de son homologue demeure normale. Cependant, l'existence d'allèles dominants semble indiquer que l'inactivation peut se propager en *trans* sur l'allèle normal. Une mutation qui entraîne une perte de fonction du gène *brown* (*bw*) est récessive et provoque des yeux marrons chez les homozygotes (*bw^l/bw^l*). La mutation *brown^{Dominant}* (*bw^D*) est due à l'insertion, au *locus* *bw*, d'un bloc hétérochromatinien qui provoque l'inactivation mosaïque non seulement de l'allèle en *cis*, mais également de l'allèle en *trans*. Toutefois, la *trans*-inactivation ne s'observe que si l'allèle inactivé *bw^D* est en mesure de s'apparier avec son homologue normal, autrement dit, l'effet dominant est perdu dans des réarrangements qui éloignent l'allèle muté de son homologue normal. La *trans*-inactivation de l'allèle normal pourrait être la conséquence du passage en *trans* de complexes multimériques à partir du bloc hétérochromatinien présent sur l'allèle muté *bw^D*. (Cela est possible car les chromosomes homologues restent appariés tout au long du cycle cellulaire chez la drosophile). De façon remarquable, il existe également une corrélation étroite entre le phénotype d'extinction mosaïque et la position de l'allèle *bw^D* au sein du noyau. En effet, ce gène est normalement situé sur un bras chromosomique; or, systématiquement, l'allèle *bw^D* est délocalisé dans la région du chromocentre. Lorsque l'on cherche des nouveaux réarrangements qui suppriment la variéation de *bw^D*, ce dernier est alors désassocié du chromocentre, indiquant que l'inactivation génique à ce locus nécessite probablement une délocalisation nucléaire dans une région hétérochromatinien [31, 32]. Chez la drosophile, la transvection et l'inactivation en *trans* sont des conséquences de l'existence de l'appariement somatique des chromosomes homologues dans les noyaux interphasiques. Ce phénomène est bien décrit chez les diptères. La paramutation laisse penser qu'un tel appariement peut se produire aussi chez les plantes,

au moins de façon transitoire. La paramutation a été décrite dans le maïs; elle correspond à une inactivation génique transcriptionnelle métastable qui peut impliquer une modification chromatinienne dans l'environnement du gène affecté [22, 33, 34]. La paramutation est transmissible, non seulement à la descendance somatique et germinale, mais aussi à un allèle homologue sauvage dans un individu hétérozygote. De plus, quand l'allèle inactivé (paramutagénique) induit l'inactivation de son homologue préalablement actif (paramutable), ce dernier devient alors aussi paramutagénique. Dans ce cas, l'information épigénétique d'extinction du gène est donc définitivement transmise à l'allèle qui était préalablement actif. La *trans*-inactivation nécessite une communication entre les allèles qui pourrait permettre l'échange de complexes répresseurs d'un allèle à son homologue.

Il semble de plus en plus manifeste que les chromosomes homologues s'apparient, au moins au niveau de certaines régions et dans certaines cellules, aussi chez les mammifères. Que l'inactivation hétérochromatinienne puisse se propager en *trans* à l'allèle sauvage permet d'appréhender un modèle pour expliquer certaines maladies humaines dominantes du système nerveux. Ainsi, en s'appuyant sur l'exemple de *bw^D*, C. Laird [35] a proposé que la maladie de Huntington pourrait être due à l'inactivation en *cis* du gène par des blocs hétérochromatiniens au voisinage de l'allèle muté. L'aspect dominant de cette maladie pourrait alors résulter de la *trans*-inactivation de l'allèle sauvage grâce au passage de composants hétérochromatiniens inhibiteurs. De nouvelles données montrent une corrélation stricte entre la maladie de Huntington, ou d'autres maladies dominantes du système nerveux, et la présence de répétitions de triplets de nucléotides au locus affecté [36]. Par analogie avec la drosophile, les séquences répétées à un taux anormalement élevé pourraient provoquer la formation de complexes inhibiteurs de type hétérochromatinien, inactivant l'allèle muté et parfois son homologue normal en *trans*. Il se trouve que

l'âge de l'apparition des symptômes est d'autant plus précoce, et la sévérité d'autant plus grande, que l'amplification des triplets est importante. Dans l'hypothèse d'un changement de structure chromatinienne locale, plus le nombre de séquences répétées est important, plus l'inactivation a, en effet, de chances de se produire. Cette interprétation expliquerait aussi remarquablement bien le mosaïcisme somatique observé dans certaines de ces maladies dues à des répétitions de triplets. Ce modèle est particulièrement attrayant dans le cas du syndrome de l'X fragile, où les répétitions sont présentes dans la région 5' régulatrice du gène muté et sont également accompagnées de séquences microsatellites, comme on en trouve dans les régions hétérochromatiniennes. Cependant, quand les répétitions se situent dans la région codante du gène, comme dans le cas de la maladie de Huntington, la dominance peut aussi être la conséquence d'une fonction néomorphe d'une protéine modifiée. Souvent ces triplets codent pour des glutamines dont on suppose qu'elles permettent des interactions protéine-protéine. Un nombre exagéré de glutamines pourrait provoquer des agrégats protéiques non fonctionnels d'autant plus importants que le nombre de répétitions est élevé.

Survenue et transmission de l'inactivation

L'inactivation épigénétique est généralement stable puisqu'elle se transmet à la descendance cellulaire somatique et parfois même aux cellules germinales (empreinte génomique parentale [37]). L'état hétérochromatinien ou euchromatinien d'un locus semble donc s'hériter de cellules en cellules, sans que l'on comprenne les mécanismes moléculaires de cette transmission (figure 5A).

Un manquement au maintien de la répression se manifeste parfois à travers les phénotypes « poivre et sel », où des spots colorés apparaissent dans une zone par ailleurs totalement réprimée, aussi bien dans les yeux mosaïques de drosophile, que dans l'épiderme des souris. La paramutation observée chez le maïs est aussi un

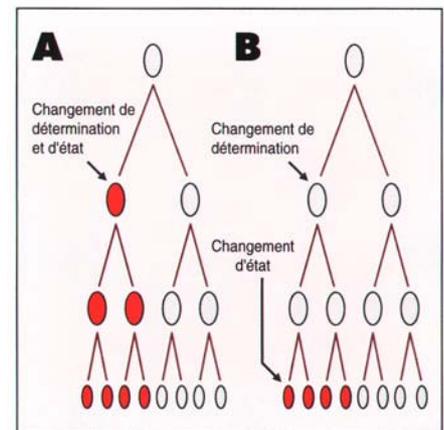


Figure 5. **Apparition et transmission de l'inactivation.** A: D'après les phénotypes mosaïques, il semble que l'inactivation par effet de position, se produise de façon stochastique et se transmette clonalement aux cellules filles. B: Des études chez la levure montrent que le changement de détermination cellulaire peut précéder de deux générations le changement de l'état d'activité d'un gène soumis à un effet de position.

phénomène métastable puisque la réactivation du gène paramuté peut s'observer, notamment sous l'influence de conditions extérieures. On peut profiter des allèles mutants thermosensibles des gènes *SIR* de levure, pour observer quand et comment l'inactivation ou la réactivation se produit sur des gènes rapporteurs aux télomères et aux loci du type sexuel. A une température non permissive, l'inactivation est impossible. Lorsque l'on replace les levures à une température permissive, on observe que l'extinction génique aux loci du type sexuel ne peut survenir qu'avec le déroulement du cycle cellulaire et au cours de la phase S de réplication [38]. Réciproquement, les études sur la variéation télomérique du gène *Ura3* chez la levure montrent que la réactivation du gène inactivé, ne peut se faire qu'à la faveur de la réplication [39]. Or, les éléments en *cis* qui permettent la répression des gènes du type sexuel chez la levure contiennent une origine de réplication (ARS) reconnue par un complexe initiateur de la réplication (ORC). Ces séquences ARS et le produit sauvage ORC2 sont indispensables à l'inactiva-

tion suggérant que cette dernière peut se produire à partir de la fourche de réplication [18]. Si le passage de la fourche de réplication déstabilise la structure chromatinienne, elle permet en aval la compétition entre des facteurs de transcription qui agissent pour maintenir un état actif de la chromatine, et les produits impliqués dans la formation d'une super-structure chromatinienne répressive. Dans ce modèle, chaque catégorie de produit doit atteindre un seuil de concentration pour l'emporter sur les compétiteurs. De façon très intéressante, l'inactivation après passage à une température permissive peut ne s'opérer que deux générations plus tard, et de façon concomitante sur toutes les cellules issues d'une même cellule grand-parentale [17] (*figure 5B*). L'inactivation, dans ce cas, est le résultat d'un changement de détermination d'une cellule unique et apparaît conjointement sur une population entière de cellules affiliées, peut-être parce que l'inactivation nécessite que les cellules aient accumulé une quantité suffisante des produits nécessaires à la constitution des complexes inactivateurs « hétérochromatiniens ».

Rappelons qu'au-delà de la transmission d'un état d'activité génique, le caractère transmissible de l'hétérochromatine est fondamental dans la stabilité chromosomique. Les produits responsables de la répression épigénétique aux télomères ou aux *loci* du type sexuel sont pour la plupart indispensables au maintien de l'intégrité des chromosomes [19, 40].

Conclusion

Plusieurs exemples d'effets de position prouvent que les changements de structure de la chromatine interviennent sur l'expression des gènes indépendamment de leur séquence nucléotidique propre, autrement dit de manière épigénétique. Les phénotypes mosaïques d'extinction génique sont les conséquences artificielles de réarrangements chromosomiques (translocations, délétions) ou de manipulations génétiques (transgènes). Mais ils permettent aussi de mettre en évidence que l'inactivation épigénétique de gènes euchromatiniens a une fonction

importante dans la détermination cellulaire des cellules eucaryotes. Chez la levure, l'information de position permet l'extinction spécifique des gènes de type sexuel aux *loci HML* et *HMR*, tandis qu'au *locus MAT*, le gène est actif et confère son type sexuel à la cellule. Chez l'homme, l'hétérochromatinisation du chromosome X permet la compensation de dose, et les phénomènes d'empreinte génomique dépendent de l'inactivation spécifique d'un des allèles en fonction de son origine parentale. Enfin, chez la drosophile, et probablement aussi chez les autres métazoaires, l'extinction définitive des gènes homéotiques en dehors de leur domaine normal d'expression fait aussi intervenir des changements de structures dans la chromatine [41]. Les produits recrutés dans la formation d'hétérochromatine ne sont manifestement pas tous identiques selon les différents endroits du génome (télomères, centromères, ou au voisinage de séquences *cis*-inactivatrices). Ces différentes structures chromatiniennes d'ordre supérieur ont cependant en commun d'inactiver de façon stable les gènes euchromatiniens.

Que les différentes formes de la chromatine aient un effet épigénétique sur l'expression des gènes eucaryotes est incontestablement prouvé par la variabilité par effet de position : la régulation d'un gène est perturbée lorsqu'il est déplacé artificiellement de son contexte génomique naturel vers un contexte chromatinienn différent. Que des structures similaires à l'hétérochromatine aient une réelle fonction dans le contrôle de l'expression génique, au cours du développement, du cycle cellulaire, ou dans d'autres processus vitaux, constitue une découverte d'importance pour comprendre la régulation épigénétique du génome des eucaryotes, en relation avec son organisation dans le noyau cellulaire ■

Remerciements

Je remercie vivement Jean-Luc Rossignol pour ses critiques précieuses et son aide constante dans l'écriture de cet article. Je remercie également Bruno Bello, Jean Deutsch, Lambert Edelman et Frank Girard pour leurs remarques constructives.

Summary

Position effect variegation: an effect of chromatin activity on eukaryotic genes expression

It is now well established that the eucaryotic nucleus is highly organized in euchromatic versus heterochromatic domains. Heterochromatin is mostly found in centromeric and telomeric regions of chromosomes whereas chromosomal arms are essentially euchromatic. The proper expression of a gene strongly depends on its chromatin structure. For instance, when delocalized to a heterochromatic area, a euchromatic gene displays a mosaic inactivation. Silencing of gene expression by heterochromatin is randomly distributed in some cells and is permanent. This phenomenon is named the position-effect variegation and has been extensively studied in *Drosophila* and yeast. Furthermore, similar silencing effects can also be observed in other organisms including mammals. In some cases, the epigenetic extinction of an allele can be transmitted to its homologous counterpart as shown by dominant variegation in *Drosophila* or paramutation in plants. Similar effects involving *cis* and *trans*-inactivating chromatin structure might also be responsible for certain human dominant diseases of the nervous system associated with an abnormal expansion of repeated sequences typically silencing gene expression in *Drosophila*. Changes in chromatin conformation are widely observed in the epigenetic control of eucaryotic gene expression. The position-effect variegation provides a useful model to better understand chromatin modification during development or during the cell cycle and how it is inherited by daughter cells leading to the permanent silencing of euchromatic genes.

Marie-Odile Fauvarque

Department of Cell Biology, Biozentrum, University of Basel, Klingelbergstrasse, 70 CH-4056 Switzerland.

TIRÉS À PART

M.O. Fauvarque.



Références

1. Wilson C, Bellen H, Gehring W. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 679-714.
2. Müller H. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* 1930; 22: 299-334.
3. Schultz J. Variegation in *Drosophila* and the inert heterochromatic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1936; 22: 27-33.
4. Reuter G, Spierer P. Position effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays* 1992; 14: 605-12.
5. Henikoff S. A reconsideration of the mechanism of position effect. *Genetics* 1994; 138: 1-5.
6. Karpen G. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Op Genet Dev* 1994; 4: 281-91.
7. Karpen G, Spradling A. Reduced DNA polytenization of a minichromosome region undergoing Position Effect Variegation in *Drosophila*. *Cell* 1990; 63: 97-107.
8. Locke J, Kotarsi M, Tartof K. Dosage-dependant modifiers of Position Effect Variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 1988; 120: 181-98.
9. Lapie P, Deutsch J. Transgénèse et utilisation de séquences « barrière » permettant de s'affranchir des effets de position. *médecine/sciences* 1994; 10: 649-56.
10. Kellum R, Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 1991; 64: 941-50.
11. Chung J, Whiteley M, Fesenfeld G. A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position-effects in *Drosophila*. *Cell* 1993; 74: 505-14.
12. Roseman R, Pirrotta V, Geyer P. The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J* 1993; 12: 435-42.
13. Gerasimova T, Gdula D, Gerasimov D, Simonova O, Corces V. A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an Enhancer of position-effect variegation. *Cell* 1995; 82: 587-97.
14. Wallrath L, Elgin C. Position-effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* 1995; 9: 1263-77.
15. Paro R. Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr Op Cell Biol* 1993; 5: 999-1005.
16. Dorer D, Henikoff S. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 1994; 77: 993-1002.
17. Laurenson P, Rine J. Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol Rev* 1992; 56: 543-60.
18. Shore D. RAP1: a protein regulator in yeast. *Trends Genet* 1994; 10: 408-12.
19. Palladino F, Gasser S. Telomere maintenance and gene repression: a common end? *Curr Op Cell Biol* 1994; 6: 373-9.
20. Allshire RC, Javerzat J-P, Redhead NJ, Cranston G. Position Effect Variegation at Fission Yeast Centromeres. *Cell* 1994; 76: 157-69.
21. Singh P, Miller JR, Pearce J, Kothary R, Burton RD, Paro R, James TC, Gaunt Singh SJ. A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 789-94.
22. Meyer P. DNA methylation and transgene silencing. In Meyer P, ed. *Petunia Hybrida. Current topics in microbiology and immunology*. Berlin: Springer-Verlag 1995; 197: 15-28.
23. Meyer P. Understanding and controlling transgene expression. *Trends Biotech* 1995; 13: 332-7.
24. Pröls F, Meyer P. The methylation pattern of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J* 1992; 2: 465-75.
25. Robertson G, Garrick D, Wu W, Kearns M, Martin D, Whitelaw E. Position-dependant variegation of globin transgene expression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5371-5.
26. Lyon M. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190: 372-3.
27. Lewis E. The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 1956; 88: 225-39.
28. Wu C. Transvection, nuclear structure, and chromatin proteins. *J Cell Biol* 1993; 120: 587-90.
29. Gans M. Étude génétique et physiologique du mutant z de *Drosophila melanogaster*. *Bull Biol Fr Belg* 1953; suppl 38: 1-90.
30. Judd B. Mutations of zeste that mediate transvection are recessive enhancers of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1995; 141: 245-53.
31. Talbert P, LeCiel C, Henikoff S. Modification of the *Drosophila* heterochromatic mutation brown dominant by linkage alteration. *Genetics* 1994; 136: 559-71.
32. Henikoff S, Jackson J, Talbert P. Distance and pairing effects on the brown dominant heterochromatic element in *Drosophila*. *Genetics* 1995; 140: 1007-17.
33. Brink R. A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* 1956; 41: 872-89.
34. Patterson G, Thorpe C, Chandler V. Paramutation, an allelic interaction, is associated with a stable and heritable reduction of transcription of the maize b regulatory gene. *Genetics* 1993; 135: 881-94.
35. Laird C. Proposed genetic basis of Huntington's disease. *Trends Genet* 1990; 6: 242-7.
36. Plassart E, Fontaine B. Genes with triplet repeats: a new class of mutations causing neurological diseases. *Biomed Pharmacother* 1994; 48: 191-7.
37. Paldi A, Jami J. Éléments chromosomiques contrôlant l'empreinte parentale des gènes. *médecine/sciences* 1996; 12: 189-91.
38. Miller A, Nasmyth K. Role of DNA replication in the repression of silent mating type loci in yeast. *Nature* 1984; 312: 247-51.
39. Aparicio O, Gottschling D. Overcoming telomeric silencing: a transactivator competes to establish gene expression in a cell cycle dependant way. *Genes Dev* 1994; 8: 1133-46.
40. Ekwall K, Javerzat JP, Lorentz A, Schmidt H, Cranston G, Allshire R. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. *Science* 1995; 269: 1429-31.
41. Orlando V, Paro R. Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Op Genet Dev* 1995; 5: 174-9.