

Inactivation du chromosome X

Quand les facteurs de pluripotence s'en mêlent

Claire Rougeulle

URA 2578, Institut Pasteur,
25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France ;
Nouvelle adresse : Unité Épigenétique
et Destin Cellulaire, CNRS/Université
Paris 7, Bâtiment Lamarck,
35, rue Hélène Brion,
75205 Paris Cedex 13, France.
claire.rougeulle@pasteur.fr

Activation et inactivation des chromosomes X dans les cellules pluripotentes

Les mammifères femelles ont beau posséder deux chromosomes X, l'activité simultanée des deux n'est pas compatible avec la survie de l'individu. Ainsi, l'un des deux X est sous une forme inactive dans la très grande majorité des cellules, et ce dès le tout début du développement. Chez la souris, c'est le chromosome X qui vient du père (Xp) qui est systématiquement inactivé au cours des premières divisions cellulaires [1-3]. Au moment de l'implantation cependant, alors que se séparent les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires, une transition importante se produit dans les cellules de la masse interne (ICM). En effet, dans ces cellules considérées comme pluripotentes par leur capacité à générer tous les tissus de l'embryon, le Xp est réactivé et les deux chromosomes X sont maintenant actifs [1, 2, 11]. Les cellules souches embryonnaires (ES) femelles, dérivées de l'ICM et pluripotentes elles aussi, maintiennent également leurs deux chromosomes X actifs. La différenciation de ces cellules pluripotentes *in vitro*, tout comme celle des cellules de l'ICM au cours du développement, s'accompagne d'une vague d'inactivation aléatoire, qui concerne cette fois soit le Xp, soit le X maternel (Xm). Les cellules ES représentent ainsi un modèle de choix pour l'étude de l'inactivation aléatoire. Une fois mise en place, l'inactivation aléatoire est stable et héritée de manière clonale au cours des divisions cellulaires, à l'exception des cellules de la lignée germinale dont le X se réactive avant l'entrée en méiose.

Xist, Tsix et la dynamique de l'inactivation de l'X au cours du développement

La dynamique de l'inactivation au cours du développement suggère donc un lien inverse entre inactivation du X et pluripotence. En effet, la réversibilité de cette inactivation ne se produit qu'en deux occasions, toutes deux liées à l'apparition de cellules pluripotentes : dans l'ICM et dans les cellules germinales primordiales. De plus, la dé-différenciation, ou reprogrammation, de cellules somatiques femelles en cellules pluripotentes, que ce soit par fusion avec des cellules pluripotentes, par transfert nucléaire ou plus récemment par transfert de gènes codant pour des facteurs associés à la pluripotence (*iPS, induced pluripotent stem cells*), s'accompagne de la réactivation du X initialement inactif [4-6]. Pour comprendre les mécanismes moléculaires permettant de connecter pluripotence et inactivation, nous nous sommes intéressés au gène contrôlant l'inactivation, *Xist*. Contrairement à la majorité des gènes, *Xist* produit un ARN non-codant nucléaire qui recouvre le chromosome à partir duquel il est transcrit et l'éteint. *Xist* est essentiel à l'inactivation, et le processus ne peut avoir lieu que lorsque des niveaux élevés de *Xist* sont produits. De même, la réactivation du Xp qui précède l'inactivation aléatoire nécessite que la copie active de *Xist* sur le Xp soit réprimée. C'est également le cas pour les cellules ES, dans lesquelles la présence de deux chromosomes X actifs s'accompagne d'une répression importante de *Xist*. Comprendre la régulation de *Xist* est donc un enjeu primordial pour compren-

dre la régulation de l'inactivation et sa dynamique au cours du développement embryonnaire. Bien que *Tsix*, un transcrite antisens à *Xist* [12], agisse en bloquant l'accumulation de transcrits *Xist* en *cis*, nous avons montré, en utilisant des cellules ES portant des mutations de *Tsix*, que ce transcrite ne joue pas de rôle direct dans la répression transcriptionnelle de *Xist* [7]. Restait alors à identifier les acteurs de cette répression, et c'est là que nous avons cherché un lien direct avec la pluripotence [8].

Nanog, Oct3/4 et Sox2 contrôlent l'activation des chromosomes X

Au cours du développement, l'expression de Nanog, l'un des facteurs clés de la pluripotence, précède dans les cellules de l'ICM la répression de *Xist* sur le Xp [2]. Nous avons donc tout d'abord regardé l'effet de mutations de Nanog sur l'expression de *Xist* dans des cellules ES. L'augmentation des niveaux de *Xist* que l'on observe en l'absence de Nanog, ainsi que la perte de cette augmentation lorsque Nanog est restauré révèle un effet répressif de Nanog sur *Xist*. Cet effet semble de plus être direct puisque notre étude montre une fixation de ce facteur de transcription au niveau du gène *Xist*. Cependant, bien que significative, cette augmentation reste modérée, ce qui suggère l'intervention d'autres éléments répresseurs. Oct3/4 et Sox2, deux autres régulateurs de la pluripotence qui agissent souvent de concert avec Nanog, représentent des candidats de choix. Nous avons montré que ces facteurs se fixent, comme Nanog, à *Xist* et surtout qu'ils restent fixés en l'absence



de Nanog, expliquant ainsi l'induction incomplète de *Xist* dans ces mutants. Par contre, la perte rapide de ces 3 facteurs au niveau de *Xist* (grâce à une manipulation génétique permettant de contrôler l'expression de *Oct3/4* dans des cellules ES) induit une activation massive de *Xist* analogue à celle que l'on observe lorsque l'inactivation se met en place.

Ces résultats démontrent que Nanog, *Oct3/4* et *Sox2* sont des répresseurs essentiels de *Xist* qui agissent en synergie pour coupler l'inactivation à la pluripotente. Leur action est indépendante de celle de *Tsix* puisque dans les différents mutants testés, l'activation de *Xist* peut se faire sans perte d'expression de *Tsix*. Nous proposons que Nanog, *Oct3/4* et *Sox2* jouent un rôle central au cours du développement précoce dans la transition entre inactivation biaisée et inactivation aléatoire, en permettant la répression de *Xist* sur le Xp et la réactivation de ce chromosome. Dans la lignée germinale, la ré-expression de *Nanog* précède l'extinction de *Xist* à l'origine de la réactivation du X [9, 10]. Dans la

mesure où *Oct3/4* et *Sox2* sont également présents dans ces cellules, il est raisonnable de penser que ces 3 facteurs participent à la reprogrammation de l'inactivation durant la gamétogenèse. Ces facteurs jouent-ils également un rôle essentiel dans le contrôle de l'inactivation de l'X chez l'humain ? Cette question reste encore en suspend, mais l'accès aux cellules souches embryonnaires humaines devrait nous permettre d'y répondre dans un futur proche. Enfin, si l'on comprend mieux maintenant comment l'inactivation du X et la pluripotente sont liées, le pourquoi de ce lien reste toujours mystérieux : la présence d'un chromosome X inactif est-elle incompatible avec l'état pluripotent ? ♦

X inactivation in embryonic stem cells is controlled by pluripotent genes

RÉFÉRENCES

- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, et al. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004 ; 303 : 644-9.
- Mak W, Nesterova TB, de Napoles M, et al. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 2004 ; 303 : 666-9.
- Huynh KD, Lee JT. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 2003 ; 426 : 857-62.
- Tada M, Takahama Y, Abe Y, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001 ; 11 : 1553-8.
- Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, et al. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 2000 ; 290 : 1578-81.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2008 ; 1 : 55-70.
- Navarro P, Pichard S, Ciaudo C, et al. *Tsix* transcription across the *Xist* gene alters chromatin conformation without affecting *Xist* transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 1474-84.
- Navarro P, Chambers I, Karwacki-Neisius V, et al. Molecular coupling of *Xist* regulation and pluripotency. *Science* 2008 ; 321 : 1693-5.
- De Napoles M, Nesterova T, Brockdorff N. Early loss of *Xist* RNA expression and inactive X chromosome associated chromatin modification in developing primordial germ cells. *PLoS One* 2007 ; 2 : e860.
- Sugimoto M, Abe K. X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet* 2007 ; 3 : e116.
- Augui S, Heard E. Inactivation du chromosome X : comment une cellule sait compter jusqu'à deux X. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 584-5.
- Vigneau S, Clerc P. Sans *Tsix*, les mâles aussi inactivent leur chromosome X. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 926-8.

NOUVELLE

Des mutations dans l'exon *HSN2* du gène *WNK1* causent la neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type 2

Jean-Baptiste Rivière, Patrick Dion, Masoud Shekarabi, Nathalie Girard, Laurence Faivre, Ronald G. Lafrenière, Mark Samuels, Guy A. Rouleau

Neuropathie héréditaire sensitive et autonome et mutations de *HSN2*

La neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type II (NHSII) tire son origine d'un désordre génétique récessif rare. Sa fréquence est plus élevée dans les populations du Québec et de l'Est du Canada puisque plus de 50 % des cas décrits proviennent de ces régions [1]. Ce

désordre se manifeste dès la petite enfance par une perte de perception de la douleur, du toucher et de la température due à une perte des neurones sensoriels périphériques [2]. En 2004, notre groupe a identifié des mutations causant la NHSII dans *HSN2* (*hereditary sensory neuropathy*), un nouveau gène encodé par un

J.B. Rivière, P. Dion, M. Shekarabi, N. Girard :

Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal (CENUM), 1560, rue Sherbrooke Est, Pavillon de-Sève, salle Y-3624, Montréal, Québec, H2L 4M1 Canada.

jbriviere01@yahoo.fr

L. Faivre : Centre de Génétique, Hôpital d'Enfants, CHU Consultation de génétique, 10, boulevard Maréchal de Lattre de Tassigny, BP 77908, 21079 Dijon Cedex, France.

R.G. Lafrenière, G.A. Rouleau : Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal (CENUM), 1560, rue Sherbrooke Est, Pavillon de-Sève, salle Y-3616-2, Montréal, Québec, H2L 4M1 Canada.

M. Samuels : Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal (CENUM), CHU Sainte-Justine, 3175 Côte-Ste-Catherine, salle A-733, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada.

seul exon localisé dans l'intron 8 du gène *WNK1* qui code pour une serine-thréonine kinase qui intervient dans la régulation homéostatique du transport ionique dans la membrane plasmique [3]. En 2001, des délétions introniques du gène *WNK1* ont été