



7. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005 ; 201 : 233-40.
8. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006 ; 441 : 231-4.
9. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007 ; 448 : 480-3.
10. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 967-74.
11. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006 ; 126 : 1121-33.
12. Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 2007 ; 19 : 409-17.
13. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 2008 ; 453 : 236-40.
14. Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008 ; 4 : 337-49.
15. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009 ; 139 : 485-98.
16. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 2009.
17. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, *et al.* The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009 ; 31 : 677-89.
18. Leung-Theung-Long S, Guerder S. Les cellules Th17 : Une nouvelle population de cellules T CD4 effectrices pro-inflammatoires. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 972-6.
19. Soumelis V, Volpe E. Différenciation des lymphocytes TH17 : Des souris et des hommes. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 925-7.
20. Sendid B, Jouault T, Vitse A, *et al.* Glycans pariétaux de levures et anticorps spécifiques : biomarqueurs et outils d'analyse physiopathologique des candidoses et de la maladie de Crohn. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 473-81.

NOUVELLE

Conservation évolutive des séquences de mémoire épigénétique Rôle dans la formation du cerveau postérieur des mammifères

Émilie Poisot, Laurent Théodore

LGBC UMR 8159 CNRS UVSQ EPHE,
45, avenue des États-Unis
78035 Versailles France.
Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.
laurent.theodore@u-psud.fr
emilie.poisot@uvsq.fr

> Chez les animaux, chaque cellule possède une identité acquise au cours du développement et maintenue au cours du temps. La détermination de cette identité résulte du choix d'exprimer, ou de réprimer, un certain panel de gènes et du maintien de ce choix. La mémoire cellulaire est ancrée dans le noyau par l'apposition puis la lecture de marques épigénétiques sur l'ADN [14] et sur les histones [15]. Composantes majeures de la chromatine, les histones sont sujettes à des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation et la méthylation, dont la combinaison constituerait un code épigénétique déterminant l'état transcriptionnel des gènes [1]. La mémorisation de l'état transcriptionnel, bien étudiée dans la régulation des gènes homéotiques (Hox) chez la drosophile [2], implique deux

systèmes antagonistes, les répresseurs du groupe Polycomb (PcG) et les activateurs du groupe trithorax (trxG). Les complexes multiprotéiques PcG et trxG modifient des histones et reconnaissent ces modifications, constituant ainsi à la fois la machinerie d'impression des marques épigénétiques et le système de lecture les interprétant (Figure 1A). Ces complexes sont conduits spécifiquement sur leur cible via la présence d'une séquence régulatrice spécifique nommée PRE (*PcG/trxG responsive element*). Chez la drosophile, les PRE sont bien définis fonctionnellement. Moléculairement, ces séquences sont difficilement reconnaissables, ce qui rend hasardeuse la prédiction de PRE dans le génome, bien que des algorithmes de reconnaissance aient été développés [3]. En dépit de la conservation des facteurs chromatiniens du

PcG/trxG et de leur fonction régulatrice chez les métazoaires, aucune séquence cible n'avait été caractérisée fonctionnellement chez les mammifères jusqu'à récemment, établissant un doute sur la conservation de leur mécanisme d'action. C'est pourquoi les travaux de Sing *et al.* [4], caractérisant un PRE impliqué dans la segmentation du cerveau chez la souris fonctionnellement échangeable chez la drosophile, représente une avancée majeure dans la compréhension du mécanisme d'action des facteurs PcG/trxG chez les mammifères.

Identification d'une séquence PRE putative chez les mammifères

La mutation *kreisler* (*kr*) chez la souris conduit à des défauts de l'oreille interne [5] et du rythme respiratoire [6], associés à une altération de la segmentation

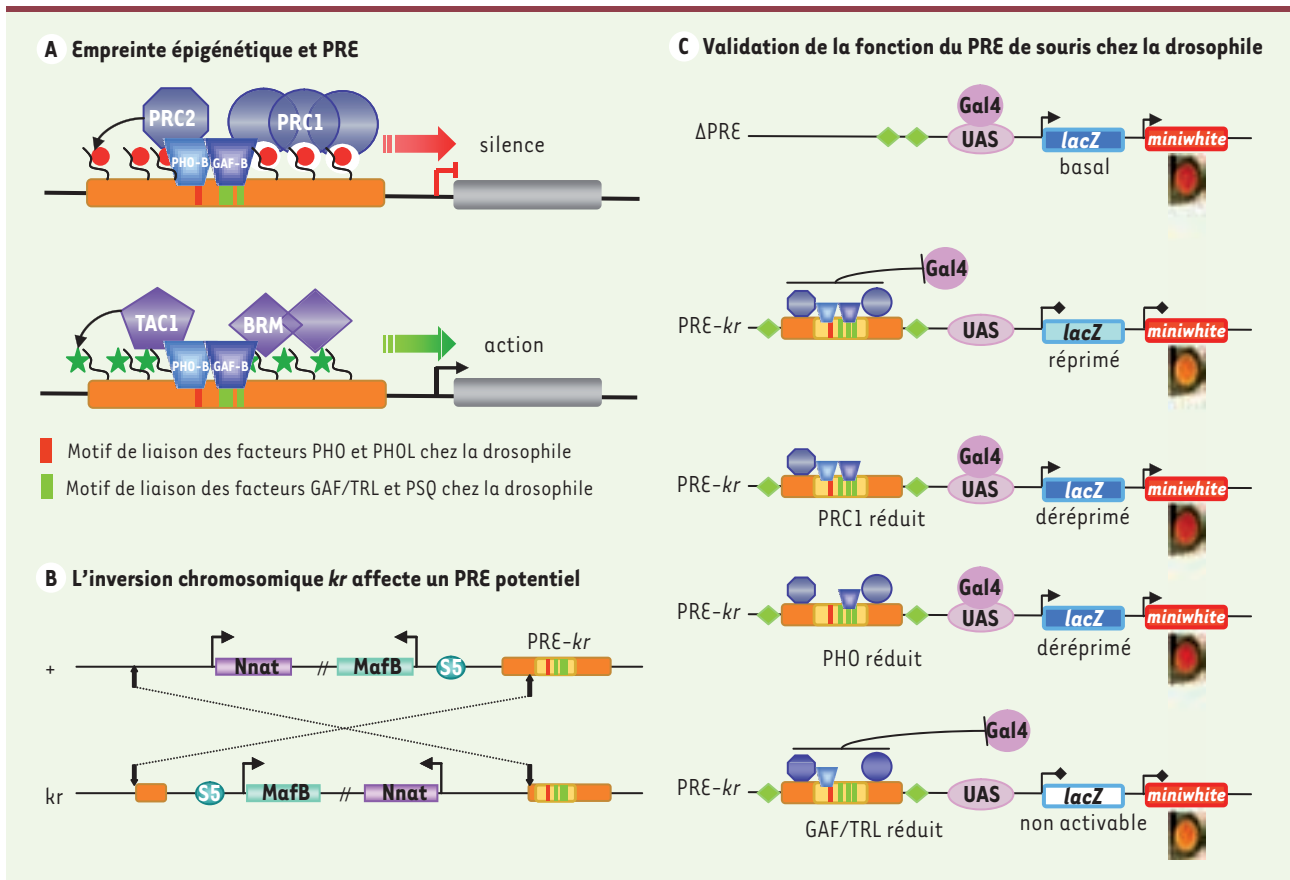


Figure 1. Les PRE, modules de régulation épigénétique conservés au cours de l'évolution. A. Modèle d'apposition/reconnaissance des marques épigénétiques par les complexes multiprotéiques composés des protéines du PcG (bleu) et du trxG (violet). La majorité des protéines du PcG/trxG ne se fixent pas directement à l'ADN, mais à la chromatine. Regroupées dans des complexes répresseurs ou activateurs (PRC2 ou TAC1), elles modifient la région N-terminale des histones (ligne courbe noire) par l'addition de groupements méthyl, acétyl, phosphate, ubiquitine... La combinaison de ces modifications et leur position constituent une empreinte épigénétique répressive (disque rouge) ou activatrice (étoile verte) lue par d'autres complexes du PcG/trxG (PRC1, BRM). Un petit nombre de facteurs du PcG/trxG lie directement l'ADN sur les motifs PHO (barre rouge, PHO-B: PHO ou PHOL), GAGA (barre verte, GAF-B: GAF/TRL ou PSQ), ou DSP1 [13] (non figuré) requis pour la reconnaissance et la fonction des PRE. Ils permettent la reconnaissance et l'ancrage des cibles régulées par les facteurs du PcG/trxG, et serviraient d'adaptateurs pour le recrutement des autres protéines du PcG/trxG. B. L'analyse des séquences autour des points de cassure de l'inversion chromosomique *kreisler* chez la souris révèle une région de 450 bp (rectangle en jaune) conservée chez la souris, l'homme et le poulet. Elle contient des motifs de fixation pour les protéines PHO/PHOL (rouge) et GAF/TRL ou PSQ (vert), motifs habituellement trouvés dans les PRE chez la drosophile, ce qui en fait un candidat pour un PRE chez les mammifères, dénommé PRE-*kr*. C. Test de validation fonctionnelle d'un PRE chez la drosophile. Le transgène [11] contient la séquence PRE-*kr* excisable (ΔPRE, système Cre-lox, losanges verts) en amont de deux gènes rapporteurs dont l'activité est mesurable chez les larves (*lacZ* qui code la β-galactosidase, inductible par le système UAS/Gal4) et les adultes (*miniwhite* qui est requis pour le dépôt des pigments dans l'œil). La présence du PRE-*kr* réprime les deux rapporteurs. L'excision du PRE-*kr* restaure leur expression (en haut). Le PRE-*kr* perd son activité répressive si la dose d'une des protéines du complexe PRC1 ou de PHO est réduite. Si celle de GAF/TRL est diminuée, l'activité des rapporteurs est encore plus réduite, ce qui suggère que les motifs GAGA sont fonctionnels et requis pour l'activité du PRE. Modifié d'après Sing *et al.* [4].

antéro-postérieure du cerveau postérieur et de la régulation d'*Hoxb-3* [7]. Elle affecte le gène *MafB* qui s'exprime normalement dans les rhombomères r5 et r6, conduisant à une dérégulation antérieure de *MafB* dans le rhombomère r3

(Figure 2). Cette mutation résulte d'une inversion du locus *MafB* n'affectant pas la région transcrite ni l'enhancer spécifique de r5-r6 (Figure 1B). Le gène voisin, codant la neuronatine, est également dérégulé et exprimé de façon

plus postérieure (Figure 2). En accord avec l'implication d'un mécanisme épigénétique à la base de cette dérégulation, l'expression de *MafB* est rétablie postérieurement en présence d'inhibiteur d'histone déacétylase, et renforcée

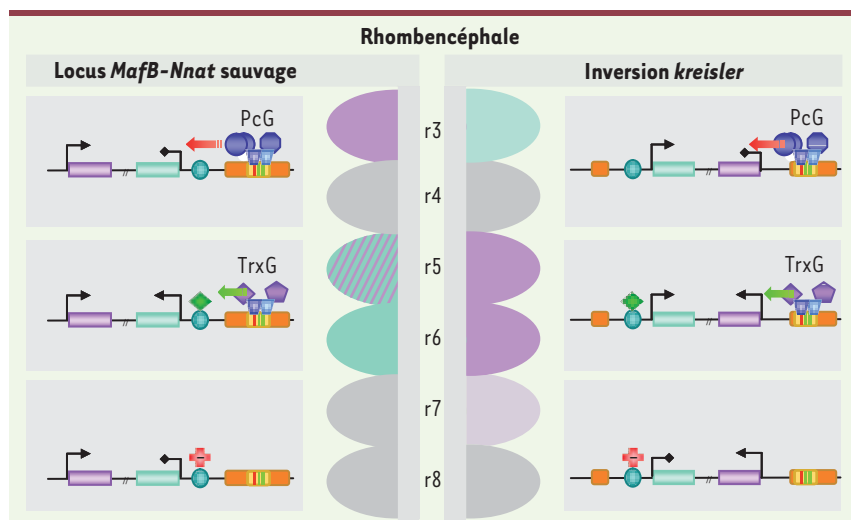


Figure 2. Régulation position-dépendante du locus *MafB-Nnat* par les complexes PcG et *trxG*.

Les gènes *Nnat* (en violet) et *MafB* (en bleu turquoise) sont exprimés de façon différentielle sur l'axe antéro-postérieur dans le rhombocéphale normal (partie gauche de la figure) et dans l'inversion *kreisler* (partie droite de la figure). Les rhombomères n'exprimant aucun des deux gènes sont représentés en gris. Dans le cerveau postérieur d'un embryon sauvage (gauche), l'expression de *Nnat* (violet) et l'absence d'expression de *MafB* signent l'identité des rhombomères r3 et r4. La forte expression de *MafB* spécifie les rhombomères r5 et r6. Les rhombomères r7 et r8 n'expriment aucun de ces deux gènes, probablement sous le contrôle

d'un répresseur indépendant des complexes PcG. Dans les embryons *kreisler* (droite), l'inversion chromosomique est associée à une perte d'expression de *Nnat* et associée à une expression ectopique de *MafB* dans r3, profil qui correspond à une postériorisation de r3. L'expression de *MafB* est perdue dans r5 et r6, alors que *Nnat* y est exprimé de façon ectopique, ce qui correspond à une antériorisation de ces deux rhombomères. L'inversion des profils d'expression de *Nnat* et *MafB* est donc corrélée à l'inversion chromosomique qui flanque ces locus dans le mutant *kreisler*. D'après les travaux publiés par Sing *et al.* [4], dans r5 et r6, l'enhancer spécifique S5 (disque bleu foncé) lié à un activateur inconnu (losange vert) permettrait la transcription de *MafB* de façon dépendante des facteurs du *trxG*. Dans le mutant *kreisler*, l'enhancer S5 éloigné du PRE-*kr* et de l'effet activateur des *trxG* serait alors inactif. *Nnat*, en revanche, rapproché du PRE-*kr*, bénéficierait de l'effet activateur dû aux protéines du *trxG*. L'expression ectopique de *Nnat* dans r3 et de *MafB* dans r7 reste à expliquer, de même que la nature d'un répresseur de l'activité de S5 dans les rhombomères r7 et r8.

antérieurement par un traitement avec un inhibiteur de DNA méthyltransférase. L'hypothèse de la présence d'un PRE altéré par l'inversion *kr* [4] a donc été avancée. Fonctionnellement, l'hypothèse est soutenue par l'observation d'une antériorisation de l'expression de *MafB* lorsque la dose d'un gène homologue du gène *Polycomb* (*Pc*), *M33/Cbx2*, est réduite. Pourtant, la recherche bioinformatique de PRE dans la région de l'inversion ne permet pas de détecter une séquence candidate. Il faut souligner la perspicacité des auteurs qui ont détecté cependant, autour de l'un des points de cassure de l'inversion, une accumulation de motifs cibles de deux facteurs PcG/*trxG* liant l'ADN chez la drosophile, Pho (*pleiohomeotic*)/YY1 d'une part, Pipsqueak et le facteur GAGA (TRL/GAF) d'autre part. La région où ces séquences sont concentrées dans le locus de souris est globalement très conservée chez l'homme (92 %) et chez le poulet (82 %). En dépit de la diffi-

culté à retrouver dans les séquences humaines une conservation des motifs détectés chez la souris, considérant que la variabilité importante des séquences de PRE entre espèces proches ne remettrait pas en cause leur fonctionnalité [8], les auteurs ont cependant choisi de tester fonctionnellement les séquences conservées du locus *MafB* (dénommées PRE-*kr*) pour leur activité PRE chez la drosophile.

Validation fonctionnelle du PRE-*kr* chez la drosophile

L'intérêt d'utiliser la drosophile pour démontrer la conservation évolutive de séquences régulatrices a déjà fait ses preuves. Par exemple, la similitude fonctionnelle entre régulation par empreinte parentale chez les mammifères et régulation par les PRE a pu être montrée en tirant parti d'un transgène composite qui associe la séquence testée à deux systèmes rapporteurs dont l'activité est mesurable chez les larves et les adultes

[9, 11] (Figure 1C). Un PRE typique de drosophile, placé dans ce transgène, possède une série de propriétés : 1) il réprime l'expression des deux rapporteurs ; 2) cette répression est levée lorsque la dose d'une protéine du PcG est réduite ; 3) la présence du PRE dans le transgène crée au site d'insertion chromosomique un nouveau site de liaison pour les protéines du PcG/*trxG*. Sing *et al.* ont retrouvé ces trois propriétés pour le PRE-*kr* du gène *MafB* (Figure 1C), indiquant que les séquences de souris se comportent comme un PRE chez la drosophile.

Caractérisation du PRE-*kr* chez la souris

Les PRE chez la drosophile permettent le maintien de l'expression génique, sans conférer par eux-mêmes un pattern d'expression spécifique. Ils sont associés à des séquences *enhancer* dont ils maintiennent l'état activé ou réprimé. Le gène *MafB* contient un *enhancer* (S5)

qui confère à lui seul une expression spécifique des rhombomères r5 et r6. Cette expression est réprimée si on associe à S5 le PRE-*kr*. Un autre élément est donc nécessaire à la régulation de *MafB* pour permettre à S5 d'être actif en dépit de l'effet *silencer* du PRE. Un élément RARE (*retinoic acid receptor binding element*) suffit à permettre l'activation de l'enhancer S5 en présence du PRE. Une dose suffisante d'acide rétinoïque (RA) permettrait donc l'activation de l'enhancer dans les rhombomères 5 et 6 en levant l'effet répresseur du PRE. En accord avec cette hypothèse, l'ajout de RA, qui dans des cellules en culture active le gène *MafB*, supprime la fixation de protéines du PcG Bmi1 et SUZ12 sur le PRE-*kr*, et diminue le niveau de méthylation H3K27me3, marque épigénétique associée à la répression génique. Enfin, la présence de copies ectopiques de PRE-*kr* dans le génome conduit à la formation de sites de liaison additionnels pour la protéine Bmi1. L'ensemble des propriétés d'un PRE, telles qu'elles ont été définies chez la drosophile, est donc retrouvé chez la souris pour la séquence PRE-*kr*.

Conclusion

La majorité des travaux récents sur les facteurs PcG/trxG ont été axés sur les marques épigénétiques apposées sur les gènes cibles, mais la question du recrutement sur ces cibles et la nature des facteurs liant directement l'ADN était difficilement abordable en l'absence de connaissance de séquences PRE modèles chez les mammifères.

Un PRE caractérisé devrait permettre d'améliorer le pouvoir prédictif encore limité des algorithmes proposés pour l'identification de nouveaux PRE chez les mammifères. Notamment, l'activation du PRE-*kr* dépend chez la drosophile du facteur TRL/GAF, dont l'orthologue n'est pas connu chez la souris. La conservation des motifs de liaison de TRL/GAF et Pipsqueak dans le PRE-*kr* suggère cependant l'existence d'un facteur liant ces motifs, homologue de TRL/GAF et/ou de Pipsqueak, qui reste à caractériser chez les mammifères. Les enjeux de ces travaux sont multiples si on considère les pathologies humaines. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de défauts de mémoire épigénétique possiblement impliqués dans des pathologies du système nerveux [12]. **PREs, sequences conveying epigenetic memory, are conserved during evolution**

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.


RÉFÉRENCES

1. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000 ; 403 : 41-5
2. Schuettengruber B, Cavalli G. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* 2009 ; 136 : 3531-42.
3. Ringrose L, Rehmsmeier M, Dura JM, Paro R. Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell* 2003 ; 5 : 759-71.
4. Sing A, Pannell D, Karaiskakis A, et al. A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* 2009 ; 138 : 885-97.

5. McKay IJ, Muchamore I, Krumlauf R, et al. The *kreisler* mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* 1994 ; 120 : 2199-211.
6. Chattonnet F, del Toro ED, Voiculescu O, et al. Different respiratory control systems are affected in homozygous and heterozygous *kreisler* mutant mice. *Eur J Neurosci* 2002 ; 15 : 684-92.
7. Manzanares M, Cordes S, Kwan CT, et al. Segmental regulation of Hoxb-3 by *kreisler*. *Nature* 1997 ; 387 : 191-5.
8. Hauenschild A, Ringrose L, Altmutter C, et al. Evolutionary plasticity of polycomb/trithorax response elements in *Drosophila* species. *PLoS Biol* 2008 ; 6 : e261.
9. Fauvarque MO, Dura JM. *polyhomeotic* regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 1508-20.
10. Lyko F, Brenton JD, Surani MA, Paro R. An imprinting element from the mouse H19 locus functions as a silencer in *Drosophila*. *Nat Genet* 1997 ; 16 : 171-3.
11. Cavalli G, Paro R. The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* 1998 ; 93 : 505-18.
12. Shi J, Levinson DF, Duan J, et al. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 2009 ; 460 : 753-7.
13. Déjardin J, Rappailles A, Cuvier O, et al. Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* 2005 ; 434 : 533-8.
14. Filion G, Defossez P-A. Les protéines se liant à l'ADN méthylé: interprètes du code épigénétique *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 7-8.
15. Ray-Gallet D, Gérard A, Polo S, Almouzni G. Variations sur le thème du code histone. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 384-9.
16. Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, et al. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group. *Cell* 2010 ; 140 : 99-110.

NOTE AJOUTÉE AUX ÉPREUVES

Un second PRE a été publié chez les mammifères après l'écriture de cette *Nouvelle* par le groupe de R.E. Kingston [16].



Tarifs d'abonnement M/S - 2010

Abonnez-vous

à Médecine/Sciences

Bulletin d'abonnement
page 337 dans ce numéro de *m/s*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

