

Reprogrammation épigénétique L'apport de l'inactivation du chromosome X

Pablo Navarro

Medical Research Council (MRC), Centre Development in Stem Cell Biology, Institute for Stem Cell Research, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, MRC EH9 3JQ, Royaume-Uni.
pablo.navarro@ed.ac.uk

> Au cours de ces dernières années, de nombreuses études suscitées par la découverte déterminante de Shinya Yamanaka [1] ont révélé l'extraordinaire puissance d'un nombre limité de facteurs de transcription dans l'induction de la pluripotence : Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc. En effet, si le développement embryonnaire peut être considéré comme une série d'étapes ordonnées au cours desquelles des cellules pluripotentes voient leur potentiel développemental réduit et restreint à un seul et unique type cellulaire (épidermique, musculaire, nerveux, hépatique, etc.), l'expression forcée de ces quatre facteurs de transcription dans des cellules somatiques (*induced pluripotent stem cells*, iPS) induit la reprogrammation de leur épigénome et rétablit tout le potentiel perdu au cours de la différenciation. Outre son intérêt pour induire la reprogrammation *in vitro*, cette nouvelle méthode d'analyse de l'épigénétique des mammifères permettra sans doute une meilleure compréhension des deux vagues de reprogrammation épigénétique qui caractérisent l'embryogenèse [2]. Ces deux stades cruciaux de l'embryogenèse consistent en : (1) la formation de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste précoce, qui nécessite l'effacement des marques épigénétiques spécifiques des gamètes ; (2) la formation de la lignée germinale, qui requiert l'effacement des marques somatiques récemment établies pour que s'établisse l'épigénotype gamétique.

Activation des deux chromosomes X dans les cellules pluripotentes (ES et iPS)

Il va de soi que la reprogrammation doit mettre en jeu un grand nombre de

mécanismes touchant tous les aspects de la vie de la cellule, du contrôle des flux d'énergie jusqu'à la restructuration du cytosquelette en passant par la mise en place du profil d'expression génique approprié. Afin de mieux appréhender ce processus, il est donc nécessaire d'analyser minutieusement les événements moléculaires qui, sur les plans chromatinien et transcriptionnel, permettent la transition d'un profil épigénétique somatique à un profil épigénétique caractéristique de cellules pluripotentes. Cette tâche est titanesque si on veut l'appréhender dans sa totalité et nécessite des approches pluridisciplinaires à large spectre en génomique, biochimie, biologie moléculaire et cellulaire, bio-informatique, modélisation, etc. Une approche plus modeste, utilisant des systèmes judicieusement choisis, pourra donc être d'un intérêt considérable pour décrypter les principes et hypothèses de fonctionnement, généralisables ensuite à l'échelle du génome entier. L'inactivation du chromosome X (mécanisme de compensation de dose des gènes liés au chromosome X rencontré chez tous les mammifères [3]), et plus particulièrement le contrôle de ses régulateurs majeurs Xist et Tsix [4], constitue un modèle pertinent pour l'étude des mécanismes de reprogrammation de cellules somatiques murines.

L'acquisition de la pluripotence *in vivo* et *in vitro* est accompagnée systématiquement par la reprogrammation de l'inactivation du chromosome X de telle façon que non seulement l'X inactif (Xi) est réactivé, mais qu'en plus chacun des deux X acquiert la compétence requise

pour pouvoir devenir à son tour l'X inactif lors de la différenciation de ces cellules pluripotentes [5]. Chez l'embryon, ce processus a lieu dans la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste, où l'inactivation passe d'un mode soumis à l'empreinte parentale (inactivation exclusive de l'X paternel) à un mode aléatoire (n'importe lequel des deux X peut être inactivé au cours de la différenciation). Par conséquent, les cellules souches embryonnaires (ES), dérivées de la MCI, disposent de deux chromosomes X actifs, et il en va de même pour les cellules pluripotentes (iPS) issues du processus de reprogrammation *in vitro*. *A contrario*, l'inactivation aléatoire d'un des deux X est mise en place lors de la différenciation cellulaire.

Réprimer Xist pour réactiver le Xi lors de l'acquisition de la pluripotence

Présent sur le chromosome X, le gène Xist produit un long ARN non codant qui a les propriétés uniques de n'être exprimé qu'à partir du Xi et de former un domaine nucléaire dédié à la répression des gènes du Xi [6]. Dans les cellules pluripotentes, l'expression de Xist est réprimée, alors que leur différenciation induit l'expression monoallélique de Xist à partir d'un seul X aléatoirement choisi, qui devient alors le Xi (Figure 1). Différentes approches ont montré que, du moins dans les cellules ES, le promoteur de Xist est réfractaire au recrutement de la machinerie basale de transcription, et est enfoui dans une structure chromatinienne fermée. En revanche, dans les cellules différenciées où l'inactivation d'un des deux X a eu lieu, le promoteur de l'allèle de Xist présent sur le Xi recrute

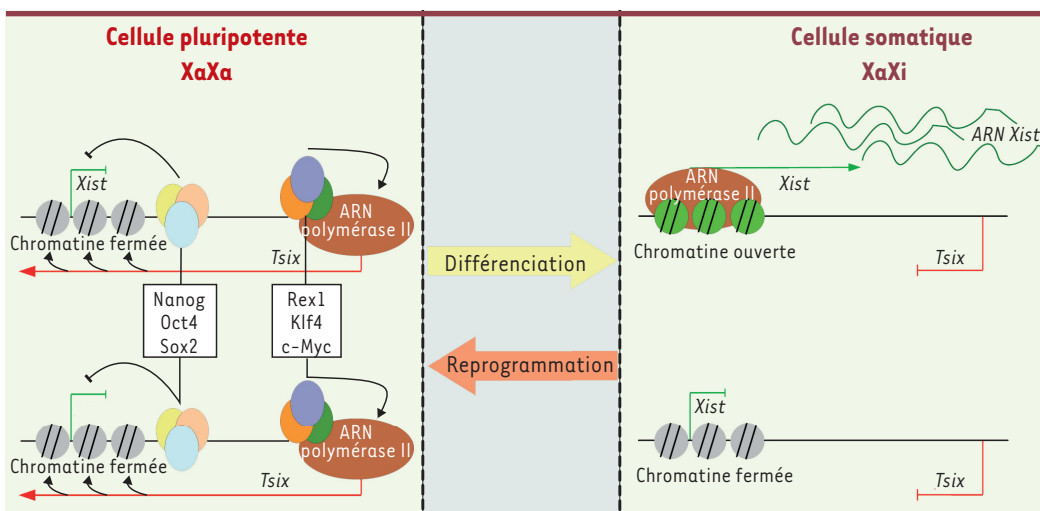


Figure 1. Couplage moléculaire entre la régulation de l'inactivation du chromosome X et la pluripotence. Dans les cellules pluripotentes, Nanog, Oct4 et Sox2 sont recrutés au niveau de l'intron 1 du gène *Xist* et maintiennent *Xist* dans un état silencieux. Rex1, Klf4 et c-Myc sont recrutés par *DXPas34* pour activer la transcription de *Tsix*. *Tsix* induit quant à lui une configuration

fermée sur le promoteur de *Xist*, en rendant tous les allèles présents épigénétiquement équivalents. Dans les cellules différenciées, une structure chromatinienne particulière différencie les allèles actifs et inactifs du gène *Xist*, qui est donc transcrit ou non, et *Tsix* n'est pas transcrit.

efficacement la machinerie de transcription et sa chromatine est enrichie en marques euchromatiques. Le promoteur de *Xist* situé sur le X actif se trouve quant à lui dans un état hétérochromatique, incapable de recruter la machinerie de transcription. Ces marques différentielles et leur acquisition au cours de la différenciation sont certainement des déterminants importants des mécanismes qui dictent quel chromosome X deviendra le Xi [4].

Tsix est un deuxième gène non codant essentiel au bon déroulement de l'inactivation de l'X. Exprimé à partir du même locus que *Xist*, mais dans l'orientation inverse, *Tsix* est un des premiers gènes antisens naturels qui ont été caractérisés. *Tsix* est fortement exprimé dans les cellules ES alors qu'il s'éteint en cours de différenciation [4]. De façon frappante, sa transcription (ou l'ARN produit) est nécessaire à la mise en place de la structure chromatinienne du locus *Xist* dans les cellules ES. En particulier, l'inactivation génétique de *Tsix* provoque l'ouverture chromatinienne du promoteur de *Xist*. Ceci entraîne l'induction systématique de *Xist* lorsque la différenciation est déclenchée. *Tsix* agit donc, dans les cellules ES, comme un régulateur spécifique de l'état chromatinien de *Xist* [4].

Il est important de signaler que l'expression forcée de *Xist* dans des cellules ES induit l'inactivation [6]. Donc, en termes moléculaires, il est primordial de réprimer *Xist* pour réactiver le Xi lors de l'acquisition de la pluripotence. Précédemment, nous avons montré que les trois piliers de l'état pluripotent, Nanog, Oct4 et Sox2, couplent la réactivation du Xi à la pluripotence par la répression qu'ils exercent directement sur *Xist* [7]. Cependant, d'autres activités sont clairement nécessaires pour reprogrammer *Xist* au cours de l'acquisition de la pluripotence : étant donné l'héritabilité potentielle des marques chromatinien-nes, la chromatine du locus *Xist* doit être « mise à zéro » pour éviter que les marques qui différencient l'allèle actif de l'allèle inactif ne perpétuent l'inactivation du Xi hérité. Cela revient à activer nécessairement *Tsix*.

Régulation de l'expression de *Tsix* : un rôle pour Klf4, c-Myc et Rex1

Après avoir montré que Nanog, Oct4 et Sox2 répriment directement *Xist* dans les cellules ES, il semblait logique d'étendre l'analyse des relations entre facteurs de pluripotence et gènes de contrôle de l'inactivation à l'étude de Klf4 et c-Myc. Dans cette nouvelle étude [8], l'emploi de l'immunoprécipitation de chromatine

a été central et a révélé que Klf4 et c-Myc sont associés à la région 5' de *Tsix* dans les cellules ES indifférenciées. De plus, le recrutement de ces deux facteurs a lieu à proximité de *DXPas34*, un minisatellite associé à *Tsix* dont l'activité *enhancer* avait été mise en évidence préalablement [9]. La délétion génétique de *DXPas34* aboutit à la perte de fixation de Klf4 et c-Myc et s'accompagne d'un défaut majeur de l'activité de recrutement de l'ARN polymérase II par le promoteur de *Tsix*. Klf4 et c-Myc sembleraient donc être les facteurs-clés de l'activation spécifique de *Tsix* dans les cellules pluripotentes. Cependant, l'expression de *Klf4* et *c-Myc* n'est pas exclusive aux cellules pluripotentes. En effet, l'analyse de cellules souches du trophoblaste, dans lesquelles l'expression de *Tsix* est fortement diminuée, a révélé la présence de Klf4 et c-Myc au niveau de la région 5' de *Tsix*. Ceci indique que d'autres facteurs, strictement spécifiques aux cellules pluripotentes, doivent donc assurer les forts niveaux d'expression de *Tsix* dans les cellules pluripotentes.

Différentes études avaient montré que *DXPas34* est constitué d'une répétition en tandem de sites de fixation pour Ctfp et $\gamma\gamma 1$, deux facteurs de transcription ubiquitaires [9]. Dans ce contexte, comme le facteur de pluripotence Rex1

est évolutivement lié à Yyl et interagit avec l'ADN au niveau de séquence de même spécificité, il devenait un candidat de choix pour réguler *Tsix* via *DXPas34*. Notre découverte du recrutement de Rex1 par *DXPas34* dans les cellules ES indifférenciées confirmait cette hypothèse [8]. En utilisant l'ARN interférence pour réduire son niveau d'expression, le mécanisme d'action de Rex1 a été décortiqué : Rex1 semble nécessaire à l'échappement de l'ARN polymérase II du promoteur pour transcrire activement *Tsix*. Rex1 ne régule donc pas l'initiation de la transcription de *Tsix*, mais son élongation, et confère à *Tsix* une activité maximale et optimale uniquement dans les cellules pluripotentes. En conclusion, *DXPas34* apparaît comme un module de recrutement de Klf4, c-Myc et Rex1 pour d'une part recruter l'ARN polymérase II au promoteur de *Tsix* (activité qui est probablement dépendante de Klf4) et d'autre part faciliter l'élongation de la transcription via l'action de Rex1 (en synergie probable avec c-Myc, voir ci-dessous).

Rôles-clés de nouveaux facteurs dans la reprogrammation

Ces résultats [8] complètent donc notre travail précédent [7] et montrent que les deux régulateurs majeurs de l'inactivation de l'X, *Xist* et *Tsix*, sont directement contrôlés par les facteurs-clés de la pluripotence et de la reprogrammation (Figure 1). Outre leur intérêt pour connaître le domaine de l'inactivation de l'X [10], ces données placent le locus *Xist/Tsix* au premier plan scientifique en tant que paradigme de

la reprogrammation épigénétique et conduisent à des hypothèses qui pourraient être extrapolées au phénomène global déclenché par l'expression forcée de *Klf4*, *c-Myc*, *Oct4* et *Sox2*. Par exemple, bien qu'essentiels au démarrage du processus de reprogrammation, ces quatre facteurs ne sont clairement pas suffisants. La réexpression d'autres facteurs-clés associés au réseau de régulation génique spécifique des cellules pluripotentes est nécessaire pour que la transition soit complètement achevée. Ceci a été démontré pour *Nanog* [11], comme anticipé par l'analyse de la régulation de *Xist* [5], et pourrait se révéler vrai pour d'autres régulateurs tels que Rex1. En effet, l'analyse de la régulation de *Tsix* suggère que Rex1 pourrait jouer un rôle-clé en donnant une spécificité développementale à l'action de c-Myc, gène à expression ubiquitaire qui est nécessaire pour que l'élongation de la transcription s'effectue correctement [12]. Par ailleurs, comme l'illustre le rôle de *Tsix* sur la chromatine, des changements locaux et globaux de la chromatine doivent certainement se produire pendant la reprogrammation pour faciliter la sortie de l'état somatique et stabiliser l'état pluripotent. À cet égard, la découverte d'ARN non codants impliqués dans la reprogrammation épigénétique [13] pousse l'analogie un pas plus loin.

L'étude de l'inactivation du chromosome X a été pionnière pour comprendre de nombreux aspects de la régulation du génome, avec la mise en évidence des ARN non codants, de la transcription antisens et de l'organisation

nucléaire. Aujourd'hui, il semble clair que ce domaine de recherche aura une place prépondérante dans la compréhension de la reprogrammation épigénétique. ♦


Epigenetic reprogramming : the importance of X inactivation

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
2. Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007 ; 128 : 747-62.
3. Chow J, Heard E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol* 2009 ; 21 : 359-66.
4. Navarro P, Avner P. An embryonic story: analysis of the gene regulatory network controlling *Xist* expression in mouse embryonic stem cells. *Bioessays* 2010 ; 32 : 581-8.
5. Navarro P, Avner P. When X-inactivation meets pluripotency: an intimate rendez-vous. *FEBS Lett* 2009 ; 583 : 1721-7.
6. Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell* 2000 ; 5 : 695-705.
7. Navarro P, Chambers I, Karwacki-Neisius V, et al. Molecular coupling of *Xist* regulation and pluripotency. *Science* 2008 ; 321 : 1693-5.
8. Navarro P, Oldfield A, Legoupi J, et al. Molecular coupling of *Tsix* regulation and pluripotency. *Nature* 2010 ; 468 : 457-60.
9. Vigneau S, Clerc P. Sans *Tsix*, les mâles aussi inactivent leur chromosome X. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 926-8.
10. Navarro P. Inactivation du chromosome X et pluripotence. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 15-7.
11. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, et al. *Nanog* is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009 ; 138 : 722-37.
12. Rahl PB, Lin CY, Seila AC, et al. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 2010 ; 141 : 432-45.
13. Loewer S, Cabili MN, Guttman M, et al. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 2010 ; 42 : 1113-7.



Tarifs d'abonnement m/s - 2011

Abonnez-vous

à médecine/sciences

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

Bulletin d'abonnement

page 486 dans ce numéro de m/s

