

L'ADN peut-il se passer de la méthylation ?

La méthylation des cytosines de l'ADN des eucaryotes est l'exemple même d'une modification épigénétique. Cette méthylation de l'ADN a été mise en examen dans l'étude de presque toutes les fonctions biologiques. Pour y voir plus clair, plusieurs équipes ont cherché à obtenir des organismes déficients pour la méthylation de l'ADN, soit par inactivation ciblée du gène codant pour l'ADN-méthyl transférase [1], soit par la recherche de mutants ayant un profil de méthylation anormal [2, 3]. L'empreinte génomique des souris déficientes pour l'ADN-méthyl transférase, récemment étudiée [4], a clairement montré l'expression perturbée de trois gènes soumis à empreinte parentale : *igf-2r*, *igf-2* et *h19* (*m/s* n° 2, vol. 10, p. 216). La méthylation de ces gènes est donc nécessaire à l'expression monoparentale. Ces résultats sont propres à la souris puisque le gène du récepteur de l'*igf2* n'est pas soumis à empreinte parentale chez l'homme (*m/s* n° 11, vol. 9, p. 1287).

Le quatrième gène connu pour subir l'empreinte parentale chez la souris (*snrpn*) n'a pas été étudié chez ces souris déficientes pour l'ADN-méthyl transférase. Un travail récent montre que ce gène est aussi soumis à empreinte parentale chez l'homme et que cette haploïdie fonctionnelle est associée à une méthylation spécifique [5]. Seul le

gène paternel est exprimé comme dans le cas d'*igf2*. La méthylation des allèles paternels et maternels est identique, à l'exception de deux sites proches, situés dans le cinquième intron : le gène exprimé est clairement méthylé comme dans le cas du gène du récepteur de l'*igf2* de la souris où un îlot CpG intronique est méthylé dans le gène actif [6]. L'intérêt de ce gène vient du fait qu'il est situé dans la région concernée par les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman (*m/s* n° 9, vol. 7, p. 974; n° 7, vol. 8, p. 742; n° 2, vol. 9, p. 232). Ces syndromes sont expliqués par l'haploïdisation de deux régions contiguës du chromosome 15, soit par délétion (80 % des malades), soit par isodisomie uniparentale [7]*. Le syndrome de Prader-Willi est la conséquence de la perte de gène(s) d'origine paternelle (délétion héritée du père ou isodisomie maternelle) tandis que le syndrome d'Angelman est causé par la perte d'expression de gène(s) d'origine maternelle. *SNRPN*, codant pour un polypeptide, abondant dans le cerveau, susceptible d'y jouer un rôle dans l'épissage des messagers,

est donc l'un des gènes pouvant expliquer le syndrome de Prader-Willi. A côté de ce gène, des fragments d'ADN non transcrits de la même région (15q11-q13) sont aussi associés à une méthylation différentielle établie lors du passage dans la lignée germinale [8].

La liste est-elle close ? Probablement non puisqu'au moins deux autres segments chromosomiques sont soupçonnés de pouvoir être imprimés, le bras long du chromosome 7 et la région 11q13. Trois cas d'isodisomie totale ou partielle du chromosome 7 humain ont été décrits [7]. Dans ces trois cas, la perte d'un segment paternel est associée à un défaut de croissance net sans déficit intellectuel [9]. Deux des trois cas avaient été identifiés parce que le cas index était porteur d'une mucoviscidose homozygote (alors que seule la mère était transmettrice) et le troisième lors de l'étude d'un cas modéré d'ostéogénèse imparfaite, ce qui suggère que le défaut de croissance est bien la conséquence de l'isodisomie maternelle et non une conséquence de la maladie associée. Par ailleurs, le syndrome atopique (asthme et allergies) est fortement lié à un locus situé en 11q13 et contenant, entre autres, la sous-unité β du récepteur des IgE. Une liaison positive entre la maladie et cette région (*lod score* de 24, *m/s* n° 12, vol. 9, p. 1418) n'est

* Situation dans laquelle deux chromosomes homologues viennent d'un seul parent [17].

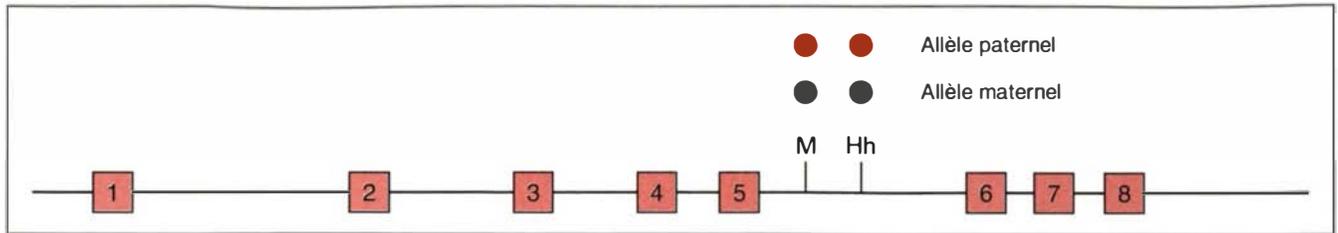


Figure 1. **Structure du gène SNRPN.** Les huit exons sont représentés par des boîtes numérotées et les deux sites dont la méthylation dépend de l'origine parentale sont représentés par les symboles M et Hh entre les exons 5 et 6. L'expression monoparentale du gène codant pour le récepteur de igf2 chez la souris est aussi associée à la méthylation d'une séquence intronique du gène actif [6]. La méthylation de l'allèle exprimé (paternel) est indiquée par la présence d'un rond rouge, et l'absence de méthylation de l'allèle non exprimé (maternel) par un rond gris. D'autres sites, situés entre le centromère du chromosome 15 et ce gène, sont méthylés dans les séquences d'origine paternelle et déméthylés dans les séquences d'origine maternelle.

retrouvée que pour les allèles d'origine maternelle [9]. Aucune association avec les allèles paternels n'est observée.

La méthylation des cytosines n'est pas propre aux vertébrés. Deux organismes déficients viennent d'être décrits : une plante (*Arabidopsis*) et un champignon (*Neurospora crassa*) [2, 3]. L'étude des vertébrés peut bénéficier des résultats obtenus lors de l'étude des autres organismes, comme le montre l'isolement récent de l'analogue bactérienne (hMSH2) de la protéine bactérienne (MutS) du système de réparation dépendant de la méthylation qui vient d'être mis en cause dans la forme non polyposique du cancer du colon ([10], *m/s* n° 2, vol. 10, p. 228). Les souches déficientes ont été obtenues par mutagenèse, suivie de la sélection de souches dont l'ADN a une méthylation réduite (*Arabidopsis*) ou absente (*Neurospora crassa*). Le seul trouble observé est une ségrégation anormale des chromosomes. Cela est facilement expliqué par le fait que l'ADN n'est méthylé chez *Neurospora* qu'au niveau des centromères et que les souches d'*Arabidopsis* ont été criblées avec des sondes provenant des régions centromériques. De telles anomalies de méthylation des séquences centromériques évoquent le syndrome ICF (*immunodeficiency, centromeric heterochromatin, facial abnormalities*) récemment décrit chez

l'homme. Cette affection associe de multiples anomalies chromosomiques, principalement décondensation et association des régions étirées, à une dysmorphie et à un déficit immunitaire, et est caractérisée sur le plan biochimique par une importante diminution de la méthylation des séquences juxtacentromériques [11]. À l'inverse, l'influence de la méthylation sur la transcription des gènes de vertébrés a sa contrepartie chez les plantes dans lesquelles l'influence du froid sur la germination et la floraison (vernalisation) pourrait s'expliquer par une déméthylation de régions critiques de certains gènes [12]. Ainsi, chez les plantes comme chez les vertébrés, la méthylation semble agir sur l'expression des gènes et sur la condensation de la chromatine. Une méthylation anormale de certaines séquences chromosomiques pourrait favoriser les remaniements constitutionnels ou somatiques, qu'il s'agisse des conséquences de la déméthylation qui s'ensuit ou des perturbations des systèmes de réparation.

Les expériences menées sur ces organismes déficients pour la méthylation de l'ADN ne permettent d'en étudier que les effets directs. Un rôle indirect de protection du génome par méthylation suivie de désamination et mutation (RIP, *repeat-induced point mutation*) lors de l'insertion de séquences étrangères est bien établi chez *Neurospora* [13].

Le bénéfice de cette propriété ne peut, bien sûr, apparaître que lorsqu'un remaniement du génome est provoqué (virus...). Le chapitre empreinte génomique n'est pas clos : lors de l'embryogenèse, le génome est globalement déméthylé puis reméthylé. Par quel mécanisme les régions soumises à empreinte génomique échappent-elles à l'effacement général ? Quelle est l'utilité de l'empreinte génomique ? Plusieurs hypothèses ont été proposées. L'une des plus logiques est celle d'un mécanisme empêchant la parthénogenèse puisque la contribution des génomes maternel et paternel est nécessaire à la viabilité d'un embryon de mammifère [14]. On doit noter aussi que l'empreinte génomique permet le « dosage des gènes imprimés »*. A.E. Reeves *et al.* (Dunedin et Auckland, Nouvelle-Zélande) viennent de rapporter un cas de gigantisme associé à une tumeur rénale de Wilms chez un enfant ayant un défaut d'impression du gène *IGF2*. Les auteurs suggèrent que la transcription d'*IGF2* à partir des deux allèles, vérifiée dans le rein et les leucocytes périphériques, est responsable de l'exagération de la croissance somatique et de la prédisposition au développement d'une

* Dosage génique : proportionnalité entre le nombre de gènes actifs et l'abondance de leurs produits.

tumeur de Wilms [15]. L'étude de ces autres régions soumises à empreinte parentale permettra-t-elle de connaître sa (ou ses) raison(s) d'être ?

M.J.

1. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyl transferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69: 915-26.
2. Foss HM, Roberts CJ, Claeys KM, Selker EU. Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science* 1993; 262: 1737-41.
3. Vongs V, Kakutani T, Martienssen RA, Richards EJ. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 1993; 260: 1926-8.
4. Li N, Beard C, Jaenisch R. Role of DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-5.
5. Glenn CC, Porter KA, Jong MTC, Nicholls RT, Driscoll DJ. Functional imprinting and epigenetic modification of the human *SNRPN* gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2001-5.
6. Stöger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP. Maternal specific methylation of the imprinted mouse *igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 1993; 73: 61-71.
7. Dreyfus JC. Quand deux chromosomes homologues viennent d'un seul parent... les disomies uniparentales en pathologie. *médecine/sciences* 1990; 6: 57-60.
8. Ditttrich B, Buiting K, Gross S, Horsthemke B. Characterization of a methylation imprint in the Prader-Willi syndrome chromosome region. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1995-9.
9. Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra c, Faux JA, Young RP, Nakamura Y, Lathrop GM, Cookson WOCM, Hopkin JM. Localisation of atopy and β subunit of high-affinity IgE receptor (FC ϵ RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993; 341: 332-4.
10. Fishel R, Lescoe MF, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038 (1993).
11. Jeanpierre M, Turleau C, Aurias A, Prieur M, Ledest F, Fischer A, Viegas-Péquiñot E. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 731-5.
12. Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 287-91.
13. Selker EU. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu Rev Genet* 1990; 24: 579-613.
14. Babinet C, Barra J, Renard JP. Le marquage et l'expression différentiels des génomes paternel et maternel: deux conditions nécessaires pour le développement à terme de l'embryon de souris. *médecine/sciences* 1989; 5: 8-15.
15. Ogawa O, Becroft DM, Morison IM, Eckles MR, Skeen JE, Mauger DC, Reeve AE. Constitutional relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism. *Nature Genet* 1993; 5: 408-12.

m/s n° 3 vol. 10, mars 94

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Défaut de transcription du locus XIST à l'origine de syndromes malformatifs sévères.** Des anomalies caryotypiques au niveau du chromosome X sont connues de longue date dans le syndrome de Turner. On en distingue deux types : des formes discrètes, où une monosomie de l'X (45,X) est trouvée chez des individus d'intelligence normale, présentant parfois de légères dysmorphies ; ces femmes diffèrent peu des femmes normales, chez lesquelles un seul chromosome X est resté actif (*m/s* n° 7, vol. 7, p. 750). En revanche, d'autres formes associent un retard mental sévère à des troubles de croissance et des malformations multiples. Il s'agit dans ce cas de formes mosaïques 45,X/46,X,r(X), où rX (*ring chromosome*) représente un très petit chromosome X circulaire ; ce chromosome rX serait incapable de s'inactiver, si bien que certains gènes seraient doublement exprimés, à partir du petit chromosome et du chromosome X normal. On sait qu'un *locus XIST*, exprimé seulement sur le chromosome inactif, marque le site supposé d'inactivation [1], et est, de ce fait, considéré comme le *primum movens* de ce phénomène inactivant, au hasard, les gènes de l'un des deux chromosomes X des femmes. L'hypothèse a été testée que ce *locus* serait absent du petit chromosome circulaire dans les syndromes de Turner sévères, empêchant le dosage de compensation de s'effectuer. Le *locus XIST* a été exploré par plusieurs techniques chez huit femmes présentant l'ensemble des signes d'un syndrome sévère [2]. Les résultats sont hétérogènes selon que la région du *locus XIST* était ou non délétée. Dans ce dernier cas, cependant, l'expression de l'ARN *XIST* était nulle ou insignifiante. Si la transcription du *XIST* est un indicateur d'inactivation, l'absence de cette transcription dans des syndromes malformatifs sévères

suggère l'existence de mutations dans la voie d'inactivation sur les petits chromosomes rX. Ces chromosomes, associés aux phénotypes sévères, seront sans doute fort utiles dans la recherche des gènes impliqués dans l'inactivation de l'X.

[1. Gilgenkrantz H. *médecine/sciences* 1991; 7: 375-7.]

[2. Migeon BR, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 12025-9.]

■■■ **Répression mitotique de la transcription.** Au cours de la mitose, la transcription des gènes par les ARN polymérases II et III est abolie. Cet arrêt transcriptionnel peut être reproduit *in vitro*, dans des extraits tissulaires auxquels est ajoutée de la cycline B1, et ne nécessite pas de modification de la chromatine. En fait, l'addition d'une protéine kinase mitotique de type p34^{cdc2} à un extrait transcriptionnel aboutit également au blocage de la transcription. Gottesfeld *et al.*, de La Jolla (CA, USA) [1], viennent de démontrer de manière concluante que la kinase MPF (*mitosis/maturation promoting factor*), formée de p34^{cdc2} couplée à une cycline B, phosphoryle des cibles du complexe TFIIIB, inhibant ainsi la transcription dépendante de l'ARN polymérase de type III. TFIIIB est un facteur transcriptionnel composé de multiples sous-unités et qui, de plus, se complexe au facteur TBP (*TATA binding protein*) et à des TAF (*TBP-associated factors*). L'inhibition de la transcription induite par la kinase mitotique peut être inversée par un traitement à l'aide de phosphatase alcaline. Cette méthode doit pouvoir être utilisée également pour préciser les cibles de la répression mitotique de la transcription dépendante de l'ARN polymérase II.

[1. Gottesfeld GM, *et al.* *Science* 1994; 263: 81-4.]