



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

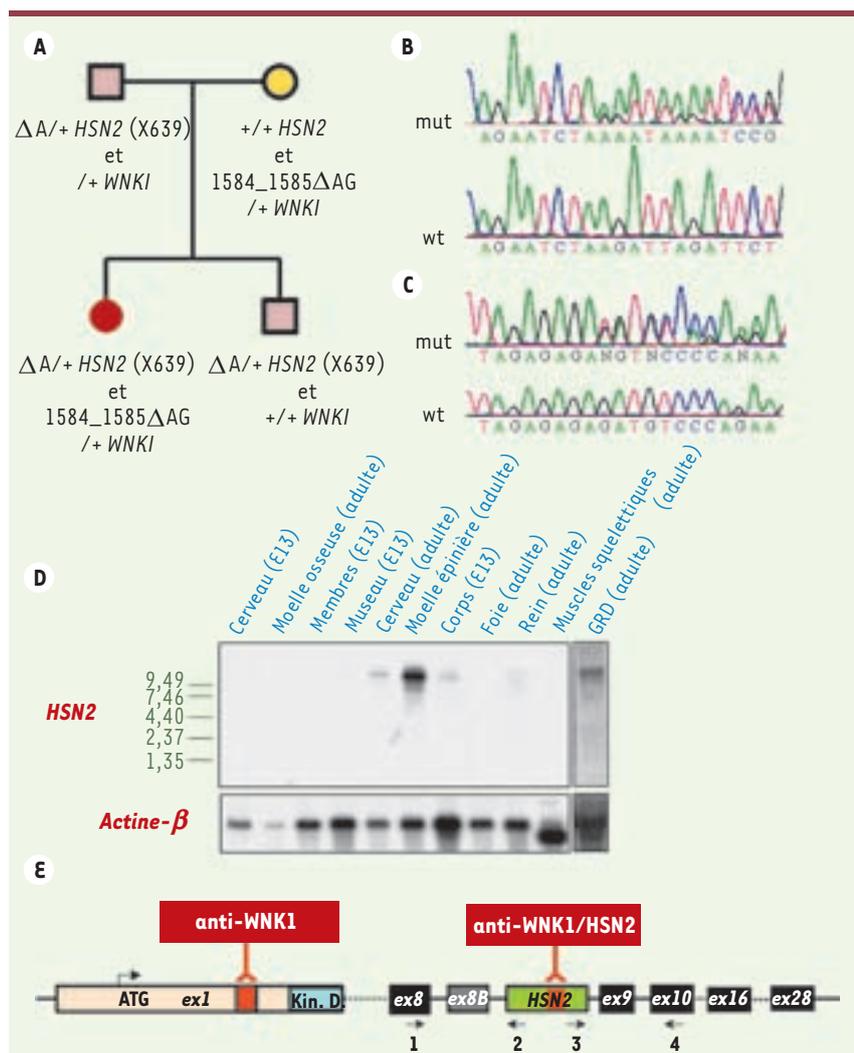
associées au pseudohypaldostérisme de type II (PHaII), caractérisé par une hypertension [4]. À l'exception de deux publications décrivant le rôle de *WNK1* dans des précurseurs de cellules neuronales [5] et détaillant son expression au cours du développement du cerveau [6], peu d'informations sur le rôle de *WNK1* dans le système nerveux ont été rapportées. Nos récents travaux démontrent que *HSN2* est finalement un exon alternatif de *WNK1* et que cet épissage produit une isoforme exclusive au système nerveux, jusqu'ici inconnue (provisoirement appelé *WNK1/HSN2*) [7].

L'observation clinique et génétique d'une famille informative

Afin de confirmer un diagnostic chez une patiente présentant les symptômes usuels

de NHaII (perte distale des sensations douloureuses, diminution du sens du toucher et de la température, absence des réflexes tendineux, etc.), une famille française nous a été adressée par le Centre de génétique de l'hôpital d'enfants de Dijon (Figure 1A). L'examen de la patiente n'a révélé ni dysautonomie ni anomalie particulière de sa pression sanguine. La lecture des séquences de *HSN2* dans cette famille a permis d'observer une délétion hétérozygote d'une paire de bases (pb) (639delA, Arg214fsX215) chez la patiente, son frère asymptotique et leur père (Figure 1B). De façon inattendue, car il s'agit d'un désordre récessif, nous n'avons pu observer de mutation du second allèle de *HSN2*. Bien que différentes études aient authentifié *HSN2* comme la cause de la NHaII [1, 3, 8] et qu'il n'y ait aucun lien génétique ou fonctionnel connu entre *HSN2*

et *WNK1*, nous avons séquencé *WNK1* et détecté une délétion de 2-pb dans l'exon 6 (1584_1585delAG, Asp531fsX547) transmise de la mère à la patiente (Figure 1C). La mère ne présentait aucun symptôme relié à une anomalie de la pression sanguine ou à la NHaII, ce qui est cohérent avec le fait que les mutations de *WNK1* associées au PHaII se traduisent par de larges délétions affectant le premier intron et entraînant toutes une surexpression de *WNK1* [4]. Étant donné que la mère et la fille ne présentent aucune anomalie de leur pression sanguine, nous pouvons conclure qu'une perte partielle de *WNK1* n'affecte pas le maintien d'une pression normale. La découverte inattendue de mutations hétérozygotes composées, l'une dans *WNK1* et l'autre dans *HSN2*, nous a mené à formuler l'hypothèse selon laquelle *HSN2* est un exon alternatif de *WNK1*.



Vérification de l'hypothèse dans un modèle murin : *HSN2* est un exon alternatif de *WNK1*

Les régions codantes et les éléments régulateurs de *HSN2* et *WNK1* sont aussi bien conservés chez la souris que chez l'humain (86 % d'identité). Nous avons donc étudié l'orthologue murin pour tester notre hypothèse. Les ARN de tissus embryonnaires et adultes de souris ont été préparés et

Figure 1. Mutations dans *WNK1/HSN2* et détection de l'ARNm de *WNK1/HSN2* par Northern.

A. Transmission des mutations dans la famille de la patiente. **B.** Séquences de la délétion d'une pb (639delA, Arg214fsX215) identifiée dans *HSN2* et **(C)** de la délétion de deux pb (1584_1585delAG, Asp531fsX547) dans l'exon 6 de *Wnk1* comparées à la séquence référence (wt). **D.** Détection de l'isoforme *Wnk1/HSN2* par Northern dans différents tissus de souris. La membrane a été hybridée avec une sonde complémentaire à *HSN2* (haut) avant d'être traitée et hybridée avec une sonde reconnaissant l'actine- β (bas). GRD : ganglion de la racine dorsale. **E.** Diagramme du gène *Wnk1/HSN2* incluant les amorces utilisées pour les RT-PCR (flèches noires) et les sites détectés par les anticorps anti-*HSN2* et anti-*Wnk1* (alpha diagnostique) (en rouge).



séparés par *Northern blot*. La membrane a été hybridée avec une sonde complémentaire à une région codante située en 3' de *HSN2*. Nous avons ainsi observé un ARNm de ~10 kb exprimé exclusivement dans les tissus du système nerveux (*Figure 1D*). Au stade E13 du développement, ce messager est davantage exprimé dans le corps que dans les parties distales comme les membres et le museau. Ces observations attestant qu'un ARNm de 10,5 kb code *WNK1* dans le cerveau [9] concordent avec celles faites par des groupes indépendants. Afin de mieux étayer nos observations montrant *HSN2* comme exon alternatif de *WNK1*, nous avons réalisé des PCR par transcription inverse (RT-PCR) à l'aide de deux paires d'amorces. L'amplification avec la première paire (amorces 1 et 2, *Figure 1E*) a révélé une bande de 160-pb propre aux tissus neuronaux (*Figure 2A*) correspondant à la taille calculée d'une amplification entre

l'exon 8 de *WNK1* et *HSN2* et une bande supplémentaire de 420-pb dans laquelle un nouvel exon en amont de *HSN2* est inclus dans le système nerveux central (exon 8b, *Figure 2A*, flèche b).

Afin de confirmer de façon plus définitive notre hypothèse, nous avons réalisé des immunodétections sur des extraits totaux de protéines préparés à partir de tissus de souris séparés par SDS-PAGE et transférés par Western. Deux anticorps ont été utilisés : l'un ciblant la portion carboxy-terminale de *HSN2* (anti-*HSN2*) et l'autre la portion amino-terminale de *WNK1* (anti-*WNK1*) (*Figure 1E*). Une protéine de ~250 kDa a été observée dans tous les tissus avec anti-*WNK1* (*Figure 2B*), ce qui est en accord avec les publications antérieures [10]. Par contre, l'anticorps anti-*HSN2* a permis d'observer une protéine de ~230 kDa (*Figure 2B*), ce qui est très différent du poids moléculaire d'une protéine encodée

uniquement par la séquence de *HSN2* (~45 kDa), mais qui correspond au poids moléculaire attendu pour une protéine encodée par l'isoforme *WNK1/HSN2*.

Conclusion

En dépit des études antérieures entourant *WNK1* et de l'absence de symptômes communs entre la *NHSAII* et le *PHAI*, nos résultats démontrent clairement l'existence d'une nouvelle isoforme de *WNK1* (*WNK1/HSN2*) dont l'expression est exclusive au système nerveux périphérique et central. Nos observations de l'ADN, de l'ARN et des protéines établissent donc de façon définitive que *HSN2* est un exon alternatif de *WNK1*. À ce jour, toutes les mutations connues causant la *NHSAII* identifiées par notre groupe, ainsi que par des groupes indépendants entraînent une troncature de la protéine *WNK1/HSN2*. Nos données génétiques montrent qu'une mutation hétérozygote dans l'exon *HSN2* est suffisante pour causer la *NHSAII* lorsqu'elle est combinée à une mutation de *WNK1* localisée sur l'autre allèle. La séquence protéique encodée par *HSN2* ne présente aucun motif ou domaine fonctionnel établi qui puisse suggérer qu'elle exerce un rôle spécifique au sein du système nerveux. Conséquemment l'impact fonctionnel de l'inclusion de cet exon dans la protéine *WNK1* demeure inconnu à ce jour.

La *NHSAII* étant caractérisée par un défaut de perception sensorielle, l'élucidation du rôle exact de *WNK1/HSN2* dans le système nerveux périphérique mènerait à une meilleure compréhension de la perception

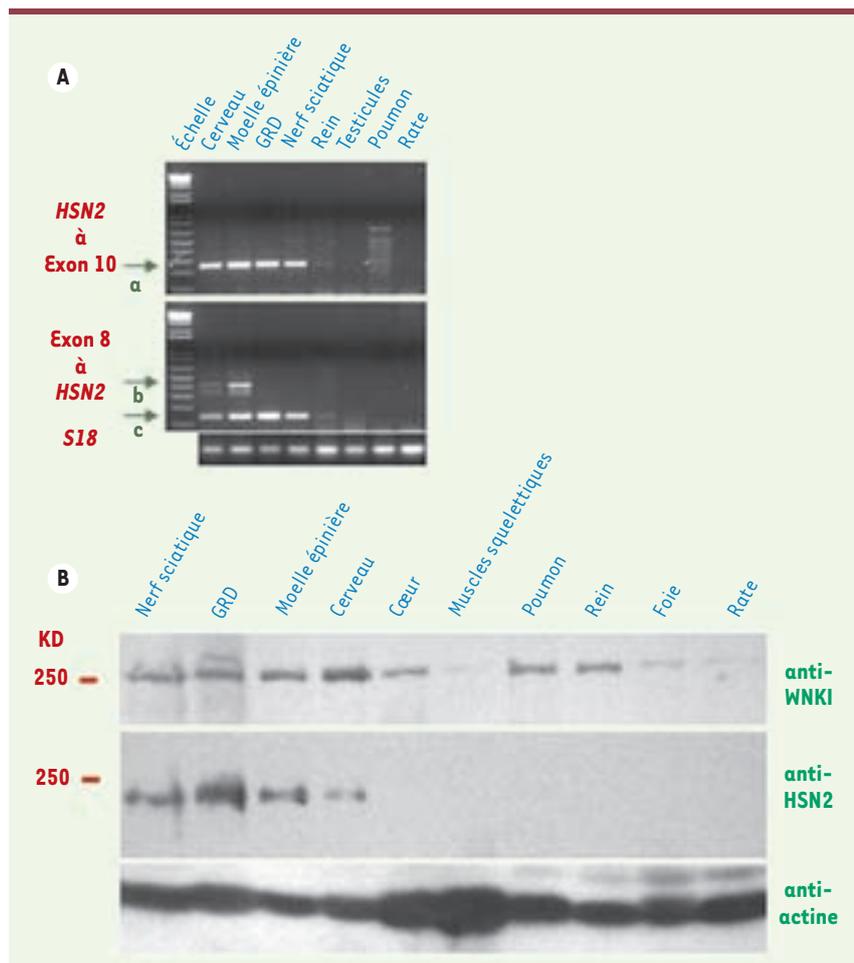


Figure 2. RT-PCR et immunodétection par Western. **A.** Amplification par RT-PCR entre l'exon 8 de *WNK1* et *HSN2* (amorces 1 et 2, bas) et entre *HSN2* et l'exon 10 (amorces 3 et 4, haut). Les flèches a, b et c indiquent les produits amplifiés. **B.** Technique de Western : immunodétections de *WNK1* (par l'anticorps anti-*WNK1*, haut) et de *WNK1/HSN2* (par l'anticorps anti-*HSN2*, milieu) à partir de divers tissus de souris. Un anticorps anti-actine a servi de contrôle afin de comparer la quantité de protéines dans chacun des puits.

