

COMMUNICATION

Initiation de l'inactivation du chromosome X durant le développement embryonnaire précoce chez la souris et l'humain

MOTS-CLÉS : INACTIVATION DU CHROMOSOME X. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE. ÉPIGÉNÈSE GÉNÉTIQUE

Initiation of X chromosome inactivation during early embryogenesis in mice and in humans

KEY-WORDS (Index medicus) : X CHROMOSOME INACTIVATION. EMBRYONIC. EPIGENESIS, GENETIC

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

Catherine PATRAT *, **, Ikuhiro OKAMOTO*, Édith HEARD *

RÉSUMÉ

L'inactivation du chromosome X (ICX) constitue un excellent modèle pour l'étude de la mise en place de marques épigénétiques au cours du développement embryonnaire. C'est un processus essentiel chez les mammifères femelles qui aboutit à la compensation dit de dose c'est-à-dire permettant d'égaliser entre les deux sexes la quantité de produits codés par les gènes du chromosome X. Plusieurs données récentes vont dans le sens d'une mise en place pendant l'embryogenèse précoce variable selon les différentes espèces de mammifères. Chez la souris, elle survient en deux phases, soumise à empreinte paternelle durant la période pré-implantatoire, puis aléatoire dans les cellules de l'embryon. Chez l'humain, l'IXC est aléatoire durant le développement embryonnaire précoce et non mise en place au stade de blastocyste. Ces résultats suggèrent une très grande diversité dans l'initiation de l'ICX chez les mammifères.

* Équipe Épigénèse et Développement des mammifères, CNRS UMR 3215/INSERM U934, Institut Curie, Paris.

** Université Paris Diderot — Biologie de la Reproduction, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris ; e-mail : catherine.patrat@bch.aphp.fr

Tirés à part : Professeur Catherine PATRAT, même adresse

Article reçu et accepté le 14 mai 2012

SUMMARY

X chromosome inactivation (XCI) is a very good model of epigenetic changes that occur during early development. This essential process occurring in females leads to X-linked gene dosage compensation between the sexes. Recent data suggest that different mammalian species may use different strategies to initiate XCI during early embryogenesis. In mice, XCI occurs in two waves, imprinted during preimplantation then random in the embryo. In humans, XCI is not imprinted and has not yet been triggered at the blastocyst stage. These results highlight the remarkable diversity of XCI mechanisms.

GLOSSAIRE

ICX : Inactivation du chromosome X

Xic : Centre d'Inactivation du chromosome X

Xist (XIST) : transcrite spécifique du chromosome X inactif, (ou X inactive specific transcript)

CSEH : Cellules Souches Embryonnaires Humaines

INTRODUCTION

La régulation épigénétique est au cœur des processus développementaux qui permettent la diversification de l'expression du matériel génétique au cours du développement et le maintien de profils d'expression spécifiques à chaque tissu, sans impliquer de modifications des séquences nucléotidiques concernées. Des mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la régulation monoallélique de certains gènes, y compris les gènes soumis à empreinte, dans l'inactivation du chromosome X (ICX) dans le sexe féminin, ou dans l'ajustement de la longueur des télomères.

L'ICX est un processus essentiel chez les mammifères femelles et aboutit à la compensation de doses des gènes liés à l'X entre les deux sexes. Un des deux chromosomes X passe, durant le développement embryonnaire précoce, d'un état euchromatique actif à un état hétérochromatique inactif, connu sous le nom de corpuscule de Barr [1]. L'ICX aboutit à l'extinction transcriptionnelle de plusieurs milliers de gènes et une fois établie, reste stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires [2]. Cet évènement représente un paradigme de l'épigénèse développementale pour diverses raisons. Il met en jeu de nombreux mécanismes allant de l'acquisition de diverses marques d'hétérochromatine au silence progressif transcriptionnel de divers gènes dont certains sont plus spécifiquement impliqués dans le développement embryonnaire précoce. Il implique une série complexe d'événements moléculaires comparables à ceux qui existent au niveau des gènes des autosomes [3]. Du fait de l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués, il constitue un modèle puissant qui permet de mieux comprendre comment les méca-

nismes épigénétiques contrôlent l'expression génique au cours du développement embryonnaire. De plus, il représente un phénomène épigénétique à l'échelle d'un chromosome entier, permettant son analyse plus facile dans le noyau. Des études faites chez la souris et l'homme ont défini une région unique du chromosome X : le centre d'inactivation du X (Xic), locus indispensable au traitement différentiel des 2 chromosomes X. La découverte du gène *Xist* (*X-inactive specific transcript*), identifié dans la région Xic, en a fait le premier acteur moléculaire important pour l'inactivation du X. Il est exprimé uniquement par le chromosome X inactif (Xi) et le transcrit fonctionnel non codant *Xist* recouvre le Xi.

Plusieurs éléments existent pour arguer que différents mécanismes d'initiation de l'ICX existent chez les mammifères. Par exemple, l'ICX existe chez les marsupiaux bien qu'aucun gène homologue de *Xist* n'ait été identifié à ce jour. Cet article décrit ce qui est connu dans la mise en place de l'ICX chez la souris et dans l'espèce humaine au cours du développement embryonnaire.

MISE EN PLACE DE L'INACTIVATION DU CHROMOSOME X CHEZ LA SOURIS

La cinétique de la mise en place de l'inactivation du chromosome X au cours du développement embryonnaire préimplantatoire chez la femelle a particulièrement été étudiée chez la souris. Après la fécondation, elle s'effectue en deux phases (Figure 1). La première phase d'inactivation survient pendant la période préimplantatoire et est soumise à empreinte parentale, le chromosome X d'origine paternelle (Xp) étant toujours inactivé [4]. Cette inactivation se maintient dans les cellules du trophoctoderme et de l'endoderme primitif du blastocyste [5], qui formeront les tissus extra-embryonnaires dont le placenta. Dans les cellules de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste, le Xp est réactivé [6]. La seconde phase d'inactivation survient alors dans la MCI, qui formera l'embryon proprement dit chez la souris, et affecte de façon aléatoire l'un ou l'autre des chromosomes X. L'état actif ou inactif de chaque chromosome X est ensuite maintenu de façon clonale dans les cellules somatiques de l'embryon alors qu'il se produit une réactivation du chromosome X inactif dans les cellules germinales.

Inactivation soumise à empreinte

Après une phase d'expression transitoire à partir du Xp quand l'embryon est au stade de 2 cellules, l'ARN *Xist* s'accumule progressivement à partir du stade 4 cellules jusqu'à recouvrir le chromosome Xp qui est alors inactivé *in cis*. La nature des mécanismes à l'origine de l'inactivation systématique de l'allèle paternel n'est pas connue et pourrait être une empreinte paternelle et/ou maternelle. La létalité précoce d'embryons disomiques pour le X (possédant deux Xm) plaide pour une résistance maternelle à l'inactivation. Cette empreinte maternelle, qui serait mise en place durant l'ovogenèse, pourrait se situer au niveau du gène *Xist*. À l'inverse, le Xp

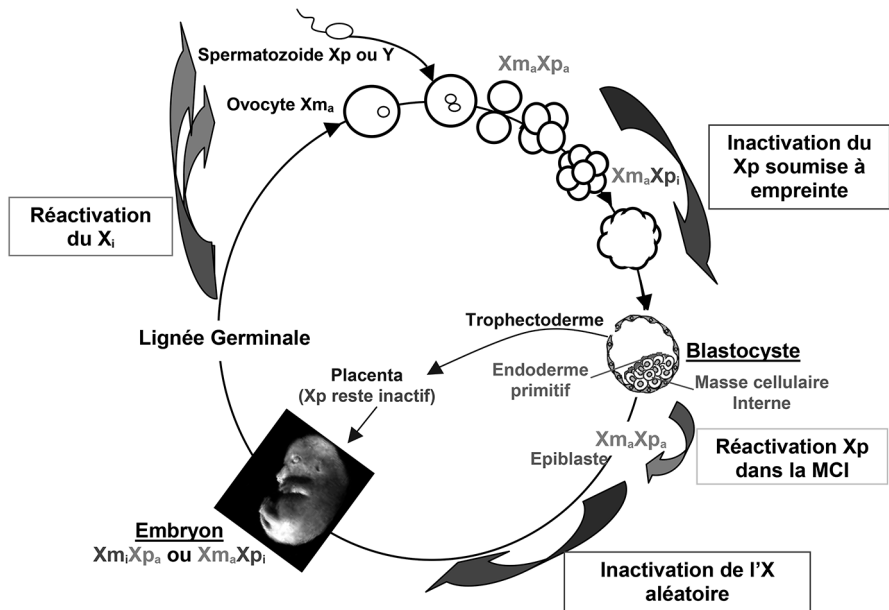


FIG. 1. — Mise en place de l'inactivation du chromosome X au cours de l'embryogénèse chez la souris.

L'ICX survient en deux phases : la première, durant la période pré implantatoire, où l'inactivation est soumise à empreinte et touche le chromosome X paternel (Xp). Cette inactivation est maintenue dans les cellules du trophoctoderme qui donneront le placenta et dans l'endoderme primitif. Dans la masse cellulaire interne du blastocyste, il se produit une réactivation du Xp. Cette réactivation est suivie de la seconde phase d'inactivation, qui survient dans les cellules du futur épiblaste, selon un mode aléatoire, et touchant soit le Xp, soit le X maternel (Xm). Une fois mise en place, l'inactivation est transmise de façon clonale dans les cellules filles sauf dans les cellules germinales où il se produit une réactivation du X inactif.

pourrait être également prédisposé à l'inactivation du fait d'une marque ou d'une empreinte qui ne serait lue qu'après la fécondation.

Une fois initiée, l'inactivation se propage à partir du Xic le long du chromosome Xp dans les deux directions. Il se produit une cascade de changements chromatiniens au niveau du Xp, incluant le recrutement de protéines du groupe Polycomb ainsi que des modifications du profil de méthylation et d'acétylation des histones [5]. On note notamment l'hypoacétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) et l'hypométhylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) dès le stade 8 cellules. Ces marques chromatiniennes précèdent l'hyperméthylation de la lysine 27 (H3K27 me3) ou l'expression des protéines du groupe polycomb (complexe Eed/Ezh2) (stade morula) puis de la lysine 9 (stade blastocyste) de l'histone H3 ou l'enrichissement du variant d'histone macroH2A (blastocyste). Au stade blastocyste, plus de 90 % des cellules du trophoctoderme ont acquis de façon stable ces diverses marques hétérochromatiques. En revanche, le profil d'expression varie au niveau des cellules de la MCI du

blastocyste et ceci, en fonction de son degré de maturation. Les premiers signes de silence transcriptionnel sont observés dès le stade 4 cellules, par l'exclusion de l'ARN polymérase II au niveau du Xp et l'absence de transcrits primaires de certains gènes dès le stade 8 cellules [7]. La fenêtre d'initiation de l'inactivation varie selon les gènes, allant du stade 4 cellules jusqu'aux stades post-implantatoires [8]. Certains gènes deviennent aussi totalement silencieux au niveau de l'allèle paternel et d'autres, à l'inverse, échappent complètement à l'inactivation et restent exprimés.

Inactivation aléatoire

Au stade blastocyste, une reprogrammation d'ordre épigénétique survient, caractérisée par la perte séquentielle et le rétablissement des différents facteurs impliqués dans l'ICX [5, 6]. Le chromosome X paternel est réactivé au stade tardif de maturation du blastocyste (4,5 jours) dans les cellules de la MCI. Cette réactivation se manifeste d'abord par la perte de l'ARN Xist qui recouvre le chromosome inactivé au préalable, puis la perte des protéines du groupe Polycomb (Eed/Ezh2), suivies par la disparition des modifications des histones caractéristiques de l'état inactif, telles que H3K27 tri-méthylée, et enfin la réactivation des gènes liés au chromosome X. Aux jours 4,5-5 de gestation, les deux chromosomes X deviennent actifs (ref. 5 et données non-publiées, I. Okomato et E. Heard). Cependant, dans l'embryon, ce statut est transitoire et ne dure qu'environ un ou deux cycles cellulaires [5]. L'inactivation aléatoire survient immédiatement après, l'inactivation d'un chromosome X étant un processus essentiel à la survie de la souris femelle. À 6,5 jours, toutes les cellules embryonnaires ont inactivé un chromosome X au hasard, aboutissant à l'expression monoallélique de la majorité des gènes qui lui sont liés. L'inactivation alors mise en place est extrêmement stable dans l'embryon, probablement à cause de la méthylation de l'ADN. Une telle dynamique d'inactivation au cours de l'embryogenèse souligne la plasticité des marques épigénétiques au cours du développement.

MISE EN PLACE DE L'INACTIVATION DU CHROMOSOME X CHEZ L'HUMAIN

Dans l'espèce humaine, la cinétique d'inactivation du chromosome X au cours du développement embryonnaire est peu connue du fait des interdictions ou des limitations de la recherche sur l'embryon humain qui existent dans la majorité des pays et du manque d'embryons humains disponibles pour la recherche. Les rares études sur le profil d'expression de *XIST* effectuées chez l'embryon humain ont montré que son expression peut être détectée dans des embryons mâles et femelles à partir du stade 5-10 cellules au troisième jour après la fécondation, indiquant que, contrairement à la situation chez la souris, *XIST* peut clairement être exprimé à partir de l'allèle maternel, seul allèle présent chez le mâle [9, 10]. Ces études ne permettraient cependant pas de statuer si l'expression de *XIST* est exclusivement

maternelle ou également paternelle. Du fait de l'expression de l'ARN XIST chez les mâles, ces études suggéraient qu'il n'est pas l'élément déclencheur de l'ICX, comme cela est chez la souris. Ces résultats n'ont pas été confirmés par une étude plus récente qui a montré que l'ICX était bien initiée à partir du stade 8 cellules de l'embryon humain, stade à partir duquel le génome embryonnaire est activé, et que le profil d'initiation était similaire à celui observé chez la souris [11].

Nous avons pu étudier la mise en place de ce processus essentiel au développement sur des embryons humains grâce à l'autorisation qui nous a été donnée par l'Agence de la Biomédecine. Nous avons adopté la même méthodologie que chez la souris pour étudier l'expression de XIST, l'expression d'autres gènes liés à l'X et la marque d'hétérochromatine H3K27me3, aux stades morula et blastocyste [12]. Nous avons observé, à la fois aux stades morula et blastocyste, une accumulation de l'ARN XIST, unique ou double, correspondant respectivement au sexe mâle ou femelle de l'embryon comme cela a été confirmé par un marquage spécifique des chromosomes X/Y par DNA FISH. Dans l'embryon mâle, 63 % (n = 2 embryons) et 67 % (n = 13 embryons) des cellules exprimaient XIST, respectivement aux stades de morula et de blastocyste. Dans l'embryon femelle, XIST était exprimé à partir des deux chromosomes dans 60 % des cellules au stade morula (n = 3 embryons) et 85 % au stade blastocyste (n = 15 embryons). Ces résultats étaient indépendants du stade de développement des blastocystes (J5 ou J6) ou de la méthode de fécondation utilisée (FIV ou ICSI). Il peut en être déduit que cette expression de XIST ne déclenche pas immédiatement l'inactivation du chromosome X, contrairement à la situation chez la souris, puisqu'aucun signe de silence transcriptionnel n'est observé à ce stade chez l'humain. Les trois gènes étudiés (ATRX, FGD1, connus pour être silencieux chez la souris dans le blastocyste, et HUWE1 échappant à l'ICX chez la souris au stade de blastocyste) restent exprimés à partir des deux allèles dans le blastocyste humain. De même, aucun signe de condensation en corpuscule de Barr, ni d'enrichissement en la marque d'hétérochromatine H3K27me3 d'un ou des deux chromosomes X n'a été observé, même au stade de blastocyste tardif.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats va dans le sens d'une différence de profils d'ICX entre la souris et l'humain. Contrairement à la souris, l'ICX n'est pas soumise à empreinte et XIST est exprimé à partir des deux chromosomes chez l'humain. L'ICX n'est toujours pas initiée pendant le développement embryonnaire pré implantatoire humain pour les gènes étudiés et se met en place très probablement juste après l'implantation (Figure 2). Comment expliquer que le chromosome X soit recouvert de l'ARN XIST sans qu'aucun signe de silence transcriptionnel n'y soit observé ? Il semblerait que l'ARN XIST soit moins bien associé au chromosome X chez l'humain par rapport à la souris pendant les stades pré-implantatoires, peut-être parce que les facteurs nécessaires à l'association étroite sont exprimés plus tard chez l'humain. Ces observations soulèvent aussi la question des différences qui peuvent

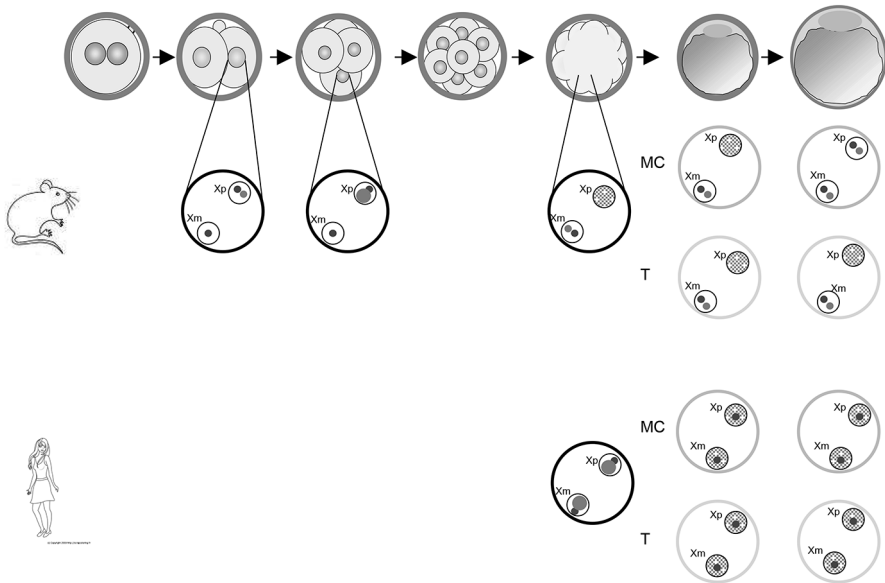


FIG. 2. — Cinétique d'expression de XIST/Xist et d'autres gènes liés à l'X au cours de développement embryonnaire pré implantatoire chez la souris et l'humain (d'après [14])

exister entre les espèces dans les mécanismes régulateurs de l'expression de XIST. On sait en effet chez la souris que l'expression de *Xist* résulte de la balance entre des mécanismes activateurs comme la protéine Rnf12 ou l'ARN non codant *Jpx*, et répresseurs comme les facteurs de pluripotence Oct4, Nanog, Sox2 ou l'antisens *Tsix* [3]. Par ailleurs, le profil d'ICX est aussi différent chez le lapin [12] malgré la proximité en termes d'évolution entre les lagomorphes et les rongeurs. En effet, il semblerait que les rongeurs sont plutôt l'exception à la règle concernant la mise en place de l'ICX chez les mammifères eutherians, probablement dû à son développement pré-implantatoire extrêmement rapide.

Ces résultats soulignent les différences remarquables qui peuvent exister chez les mammifères concernant la mise en place de processus majeurs durant le développement embryonnaire précoce, le modèle animal n'étant pas toujours superposable à ce qui existe chez l'humain. L'étude de l'ICX dans l'espèce humaine, paradigme de l'épigénèse, est donc d'importance capitale et est un excellent modèle d'étude pour appréhender diverses situations :

- Comprendre le processus épigénétique de l'ICX pour mieux appréhender des situations pathologiques comme certains cancers, dont on sait qu'ils sont liés à des modifications épigénétiques perturbant l'expression génique,
- Caractériser précisément la situation des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) susceptibles d'être utiles pour des études de différenciation cellulaire. Ces cellules constituent une excellente approche expérimentale pour

explorer la mise en place de mécanismes physiologiques régulant l'expression des gènes et les dysrégulations qui pourraient en découler. Elles suscitent de formidables espoirs dans la perspective de nouveaux outils thérapeutiques car elles représentent aussi une source éventuelle de cellules différenciées vers des voies précises pour la production de tissus ou de cellules à utilité thérapeutique. Mais à l'heure actuelle, leur utilisation ne semble pas avoir systématiquement été précédée de tous les contrôles de qualité et de reproductibilité nécessaires. Des données récentes sur les CSEh et l'ICX sont autant d'arguments. Il existe en effet une grande variabilité de l'ICX selon les clones, avec des profils d'expression de XIST ou des marques épigénétiques différents selon les clones et les conditions de culture [13, 14]. L'ensemble de ces résultats soulève la question de l'épigénotypage des CSEh, de sa variabilité et de sa signification physiologique.

- Apporter des éléments de réponse aux inquiétudes suscitées par les dysfonctionnements épigénétiques éventuels après Assistance Médicale à la Procréation (AMP) dans l'espèce humaine, suite à l'augmentation rapportée de maladies soumises à empreinte chez les enfants conçus par AMP.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARR M.L., BERTRAM E.G. — A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 1949, 163, 676-677.
- [2] LYON M.F. — Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 1961, 190, 373.
- [3] AUGUI S., NORA E.P., HEARD E. — Regulation of X chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat. Rev. Genet.*, 2011, 12, 429-42.
- [4] TAGAKI N., SASAKI M. — Preferential inactivation of the paternal derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 1975, 256, 640-642.
- [5] OKAMOTO I., OTTO A.P., ALLIS C.D., REINBERG D., HEARD E. — Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, 2004, 303, 644-649.
- [6] MAK W., NESTEROVA T.B., DE NAPOLES M., APPANAH R., YAMANAKA S., OTTE A.P., BROCKDORFF N. — Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, 2004, 303, 666-669.
- [7] OKAMOTO I., ARNAUD D., LE BACCON P., OTTE A.P., DISTECHE C.M., AVNER P., HEARD E. — Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature*, 2005, 438, 369-373.
- [8] PATRAT C., OKAMOTO I., DIABANGOUAYA P., VIALON V., LE BACCON P., CHOW J., HEARD E. — Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 31, 106, 5198-203.
- [9] RAY P.F., WINSTON R.M., HANDYSIDE A.H. — XIST expression from the maternal X chromosome in human male preimplantation embryos at the blastocyst stage. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, 6, 1323-7.

- [10] DANIELS R., ZUCCOTTI M., KINIS T., SERHAL P., MONK M. — XIST expression in human oocytes and preimplantation embryos. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 61, 33-39.
- [11] VAN DEN BERG I., LAVEN J., STEVENS M., JONKERS I., GALJAARD R.-J., GRIBNAU J., VAN DOORNINCK H. — X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos. *Am. J. Hum. Genet.*, 2009, 12, 84(6), 771-779.
- [12] OKAMOTO I., PATRAT C., THEPOT D., PEYNOT N., FAUQUE P., DANIEL N., DIABANGOUAYA P., RENARD J.P., WOLF J.P., DURANTHON V., HEARD E. — Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature*, 2011, 472 (7343), 370-374.
- [13] SILVA S.S., ROWNTREE R.K., MEKHOUBAD S., LEE J.T. — X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 4820-4825.
- [14] SHEN Y., MATSUNO Y., FOUSE S.D., RAO N., ROOT S., XU R., PELLIGRINI M., RIGGS A.D., and FAN G. — X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a non random pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 4709-4714.

