

COMMUNICATION

Une épimutation transgénérationnelle du gène *MMA-CHC* produit un nouveau type d'erreur innée du métabolisme dénommée *épi-cblC*

MOTS-CLÉS : ÉPIGÈNESE GÉNÉTIQUE. ERREURS INNÉES DU MÉTABOLISME. COBAMIDES

A transgenerational MMACHC epimutation illustrates a new mechanism of inborn errors of metabolism named epi-cblC

KEY WORDS: EPIGENESIS, GENETIC. METABOLISM, INBORN ERRORS. COBAMIDES

Jean-Louis GUÉANT ¹, Céline CHÉRY ¹, Abderrahim OUSSALAH ¹, Jean-Pierre NICOLAS ¹, Jacek MAJEWSKI ², David S. ROSENBLATT ²

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêt à déclarer en relation avec cet article.

RÉSUMÉ

Un groupe de maladies rares résulte du blocage de l'utilisation de la vitamine B12 au niveau cellulaire. La plus fréquente d'entre elles, dénommée cblC, est à transmission autosomique récessive, produite par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites des deux allèles du gène MMACHC. Nous avons mis en évidence un nouveau type de cblC que nous avons dénommé épi-cblC sur un nourrisson décédé d'une forme grave de cblC, et qui ne

1. INSERM UMR_S1256, Nutrition-Génétique-Exposition aux risques environnementaux et Centre de Référence des Maladies Héritaires du Métabolisme, Université de Lorraine et CHRU de Nancy 54505, Nancy, France ;

2. Department of Human Genetics, McGill University and Research Institute McGill University Health Centre, Montreal, H4A 3J1, Quebec, Canada. Correspondance : Jean-Louis Guéant, MD, DSc, INSERM UMR_S1256, Nutrition-Génétique-Exposition aux risques environnementaux et Centre de Référence des Maladies Héritaires du Métabolisme, Faculté de Médecine, 9, avenue de la Forêt de Haye, B.P. 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France, Tél : (33) 3 83 68 32 92, Fax : (33) 3 83 68 32 79, e-mail : jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

Tirés-à-part : Professeur Jean-Louis GUÉANT, Nutrition-Génétique-Exposition aux risques environnementaux, Faculté de Médecine – BP184, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy ;
e-mail : jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

Article reçu le 7 février 2018 et accepté le 23 avril 2018

présentait paradoxalement qu'une mutation à l'état hétérozygote. En réalisant l'étude des groupements méthyles sur l'ensemble du génome (méthylome) nous avons identifié une épimutation sur la deuxième copie du gène dans 3 générations et dans le sperme du père du cas index. À ce jour, la plupart des épimutations rapportées chez l'homme sont somatiques et effacées dans les cellules germinales. L'épimutation éteint l'expression de l'allèle non muté du gène MMACHC. Le gène MMACHC, orienté en sens 5'-3' appartient à un trio de gènes. Il est flanqué de deux gènes CCDC163P et PRDX1, tous deux orientés en sens inverse. L'épimutation résulte d'une mutation de PRDX1 qui force la transcription antisens de MMACHC et produit une marque H3K36me3 au niveau du promoteur commun à CCDC163P et MMACHC. Nous avons retrouvé 8 autres cas d'épi-cblC en Europe et aux USA et nous avons identifié plus d'une quarantaine de trio de gènes ayant la même configuration sur l'ensemble du génome. Ces 8 cas d'épi-cblC illustrent la nécessité de rechercher une épimutation au niveau des gènes localisés dans des trios de configuration similaire, lorsque des patients présentant les manifestations typiques d'une maladie rare récessive malgré l'existence d'une mutation à l'état hétérozygote.

SUMMARY

A group of rare diseases is produced by a genetic defect of vitamin B12 cellular metabolism. The most common of these diseases, called cblC, is recessive, with identical or composite mutations of the two alleles of MMACHC gene. We have found a new type of cblC that we named epi-cblC in an infant deceased from a severe form of cblC, which paradoxically only showed a mutation in the heterozygous state. By carrying out the study of methyl groups on the whole genome (methylome) we have identified an epimutation on the second copy of the gene in 3 generations and in the sperm of the father of the index case. To date, most epimutations reported in humans are somatic and are erased in germ cells. The epimutation turns off the expression of the non-mutated allele of the MMACHC gene. MMACHC belongs to a trio of genes. It is flanked by two genes CCDC163P and PRDX1, which are in opposite sense. The epimutation results from a PRDX1 mutation that forces MMACHC antisense transcription and produces an H3K36me3 mark at the CCDC163P and MMA-CHC common promoter. We found 7 other cases of epi-cblC in Europe and USA and we identified more than forty gene trios with the same configuration on the whole genome. The 8 cases of epi-cblC illustrate the need to look for an epimutation in gene trios with similar configuration, when patients present typical manifestations of a rare recessive disease despite the presence of a heterozygous mutation.

INTRODUCTION

Les maladies épigénétiques sont causées par des altérations stables de la méthylation de l'ADN, de la modification des histones post-traductionnelles et / ou de la production d'ARN non codant. Ces traits phénotypiques peuvent être transmis par les parents à leur progéniture dans de nombreux modèles expérimentaux [1, 4]. Ils sont appelés épimutations lorsqu'il s'agit de la méthylation d'ilôts CpG de l'ADN qui est directement impliquée dans les mécanismes sous-jacents de la maladie. Les épimutations peuvent être séparées en deux types, primaire et secondaire, ces derniers étant secondaires à une mutation sur un autre gène en cis ou en trans par rapport à l'épiallèle [1, 2]. Dans la plupart des cas, les épimutations sont somatiques

et sont susceptibles d'exister sous forme de mosaïques avec des effets spécifiques aux tissus [2-4]. À notre connaissance, à ce jour, il n'y a aucune épimutation rapportée chez l'homme qui soit maintenue dans les lignées germinales [2]. Par exemple, une épimutation a été rapportée dans 3 générations, dans un syndrome de cancer familial produit par l'extinction épigénétique du gène *MLH1*. Cette épimutation est effacée dans les spermatozoïdes, mais est réintégrée dans les cellules somatiques de la génération suivante [2, 5].

Ici, nous rapportons des cas présentant une épimutation dans une maladie rare du métabolisme cellulaire de la vitamine B12 récessive dénommée *cblC* dans sa forme habituelle et qui est classiquement produite par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites dans le gène *MMACHC* [6, 7]. Ce gène code une protéine ayant à la fois un rôle de chaperonne et une fonction enzymatique. Son inactivation perturbe la transformation de la vitamine B12 (cobalamine, Cbl) en deux co-enzymes, la méthylcobalamine (MeCbl) et l'adénosylcobalamine (AdoCbl), qui servent respectivement de cofacteurs pour la méthionine synthase et la méthylmalonyl-CoA mutase [6, 8]. La maladie de type *cblC* peut se traduire par des manifestations cardio-métaboliques sévères dans les semaines après la naissance et des troubles neurologiques et hématologiques, dont une anémie mégaloblastique [6, 7]. Nous rapportons un nouveau type de *cblC* que nous avons dénommé « *épi-cblC* » [10]. Les cas d'*épi-cblC* sont hétérozygotes composites pour une mutation génétique sur l'un des allèles associée à une épimutation sur l'autre allèle du gène *MMACHC*.

Identification d'un nouveau type de *cblC* que nous avons dénommé « *épi-cblC* »

Nous avons initialement identifié l'épimutation secondaire de *MMACHC* chez deux nourrissons avec transmission paternelle, le cas CHU-12122 (mort à un mois, ascendance caucasienne) et le cas WG-3838 (mort à deux mois, ascendance japonaise et coréenne) et un homme de 59 ans (cas WG-4152, ascendance caucasienne). Le diagnostic *cblC* était basé sur des analyses métaboliques et de complémentation des fibroblastes. Le séquençage de *MMACHC* dans l'ADN sanguin du CHU-12122 a révélé une seule mutation c.270_271insA, p.Arg91LysfsX14 hétérozygote. Cette mutation hétérozygote a été également identifiée chez sa mère et son grand-père maternel, qui présentaient une augmentation modérée de l'homocystéine sans manifestation clinique (figure 1). Nous avons effectué une analyse de méthylation du gène *MMACHC* qui a révélé une épimutation hétérozygote consistant en 32 sites CpG hyperméthylés dans un îlot CpG englobant le promoteur et le premier exon de *MMACHC* (figure 1). L'épimutation a été transmise à CHU-12122 par son père, et à son père par son grand-père. Elle était présente dans le sperme du père de CHU-12122. L'allèle *MMACHC* portant la mutation c.270_271insA était le seul détecté dans les fibroblastes du patient, et le traitement des fibroblastes par un inhibiteur des ADN méthyltransférases (DNMT), la 5-azacytidine (5-AZA), restaurait l'expression des deux allèles, ce qui indiquait que l'épimutation produisait l'extinction de l'allèle non muté.

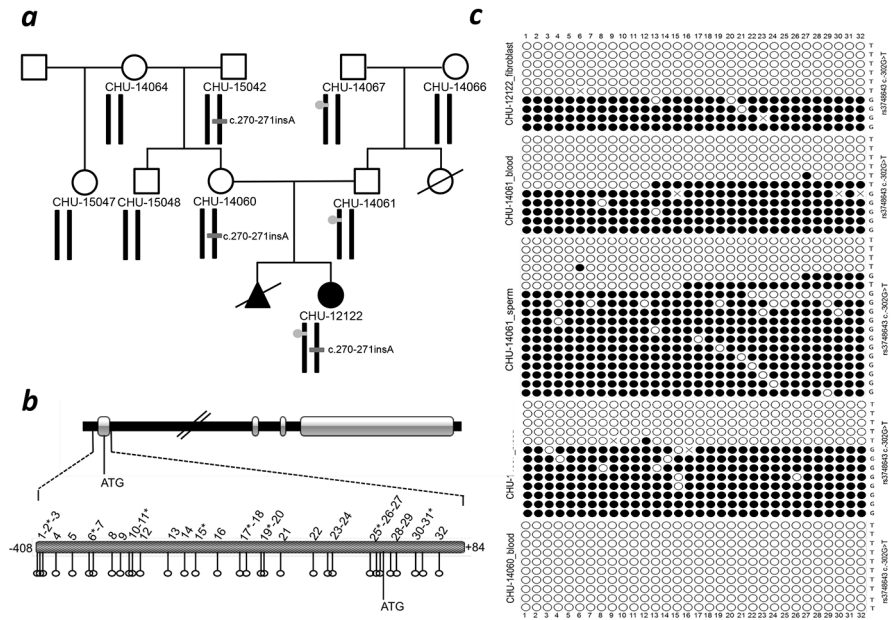


FIG. 1. — Le cas CHU-12122 d'*épi-cblC* est hétérozygote composite pour une mutation codante et une épimutation de *MMACHC* détectée dans 3 générations. (a) Pedigree de la famille du cas CHU-12122 ; barre rouge, mutation (hétérozygote c.270_271insA, p.Arg91LysfsTer14) trouvée dans le cas index, sa mère, et son grand-père maternel ; le cercle vert indique l'épimutation englobant le promoteur / exon 1 de *MMACHC* trouvée dans le cas index. (b) Carte du gène *MMACHC* et vue agrandie de l'îlot CpG couvrant son promoteur et l'exon 1. Les sites CpG sont numérotés en fonction de leur position en amont et en aval d'ATG. Les astérisques indiquent les sites CpG qui ont été identifiés par la puce HM450K Illumina. (c) Épigrammes de la méthylation de *MMACHC* analysée par amplification par PCR/clonage/séquençage Sanger de l'ADN traité par bisulfite. Des épimutations ont été détectées chez le cas index, son père et son grand-père paternel.

Une présentation similaire a ensuite été trouvée dans deux cas d'Amérique du Nord. Le cas WG-3838 était également un cas gravissime chez un nourrisson quelques semaines après la naissance qui présentait un variant d'épissage c.81G>A hétérozygote rapporté précédemment chez la patiente, sa mère et un frère décédé (figure 2a). Aucune mutation paternelle de *MMACHC* n'avait été identifiée. Nous avons identifié la même épimutation mono-allélique que celle du cas CHU-12122 dans l'ADN du cas index et dans l'AND et les spermatozoïdes de son père. Le troisième cas, WG-4152, était un adulte hétérozygote composé pour une mutation c.158T>C et l'épimutation *MMACHC*.

Nous avons effectué une étude du méthylome couvrant tout le génome chez les 3 cas d'*épi-cblC* et leurs proches (figure 2). L'analyse « épi-Manhattan » montrait que l'épimutation de *MMACHC* était la seule signature identifiée, avec une significati-

vité statistique élevée (figure 2). Nous avons observé un seul sujet dans une population témoin des USA avec la même hyperméthylation du promoteur du gène *MMACHC*, et avons conclu à une fréquence allélique de l'épimutation inférieure à 5×10^{-4} dans la population témoin. Nous avons également confirmé l'absence d'épimutation de *MMACHC* dans plusieurs cas classiques homozygotes de *cb1C*. Par analyse ChIP-Seq sur la chromatine des fibroblastes, nous avons observé une accumulation significative de lysine 36 triméthylée sur l'histone H3 (H3K36me3) dans la région promotrice de *MMACHC* et la partie proximale du gène *CCDC163P* adjacent chez les 3 cas *épi-cb1C* (figure 3). Cette signature était absente dans les échantillons témoins.

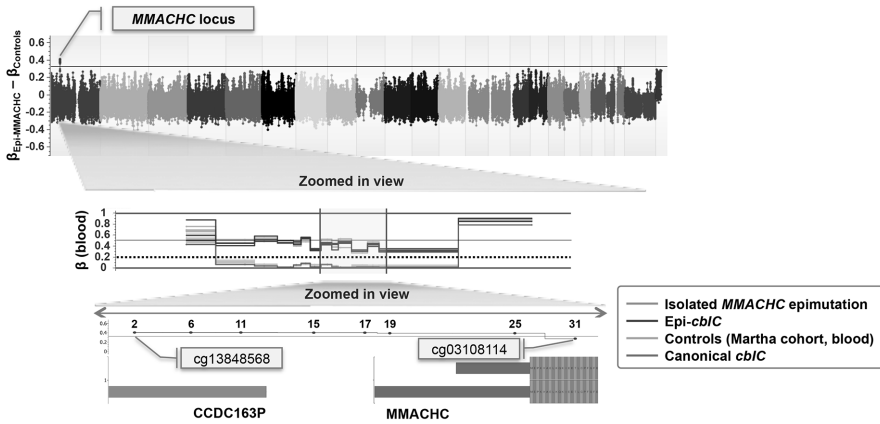


FIG. 2. — Les analyses de l'épigénome (méthylome) sur l'ensemble du génome confirment la présence de l'épimutation dans l'ADN génomique des cas indexes et le sperme de leurs pères. Haut : épi-Manhattan représentant en abscisse les différences de valeurs β entre les sujets *épi-cb* et les témoins. La ligne horizontale indique une différence de 0,3 ; bas : vue agrandie du locus *MMACHC* avec les valeurs β des sondes CpG dans le gène *MMACHC* observe dans les cas *épi-cb1C*, la parentèle porteuse de l'épimutation et des sujets contrôles. La ligne pointillée avec une valeur β de 0,2 est considérée comme la limite indiquant l'absence de méthylation.

L'épimutation de *MMACHC* est secondaire à une mutation sur un gène adjacent, *PRDX1*

Nous avons effectué le séquençage du génome entier (WGS) des trois cas et de leurs parents afin de déterminer si l'hyperméthylation du promoteur de *MMACHC* était une épimutation secondaire à une mutation sur un autre gène [1,2,16]. Les seules mutations identifiées étaient dans le gène *PRDX1* situé à côté de *MMACHC* et sur le brin opposé (figure 4). Nous avons trouvé une mutation *c.515-1G>T* de *PRDX1* dans les cas CHU-12122 et WG-4152 et une mutation *c.515-2A>T* dans le cas WG-3838 (figure 4b). Ces mutations ont également été trouvées chez les parents qui portaient l'épimutation secondaire, c'est-à-dire le père et le grand-père paternel du CHU-12122 et le père du WG-3838 (figure 4).

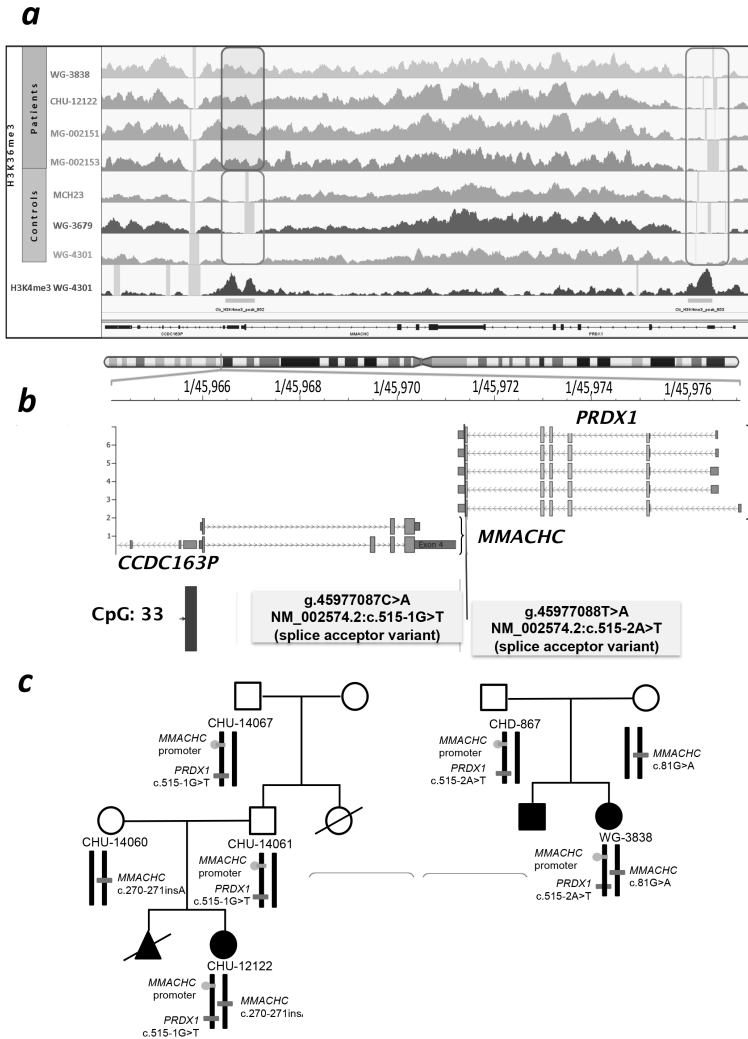


FIG. 3. — L'épimutation sur le gène *MMACHC* est associée à une signature de chromatine H3K36me3 au niveau du promoteur et une mutation dans le gène adjacent *PRDX1*. (a) Les analyses ChIP-Seq à la région génomique englobant les promoteurs de *MMACHC* / *CCDC163P* et *PRDX1* montrent une signature triméthylée lysine 36 (H3K36me3) sur l'histone H3 chez les patients (pistes 1 à 4 à partir du haut) et les témoins (pistes 5 à 7). La signature H3K4me3 n'est pas discriminante. Les rectangles indiquent les régions promotrices. (b) Identification par séquençage du génome entier (WGS) des mutations de *PRDX1* dans les cas *épi-cblC*. (c) Pedigrees dérivés des analyses WGS dans les cas indexés et leurs familles. L'analyse par WGS retrouve les mutations *c.515-1G>T* et *c.515-2A>T* de *PRDX1*, dans les cas indexés CHU-12122 et WG-3838 et leurs ascendants porteurs de l'épimutation secondaire. Les mutations sont absentes chez les parents hétérozygotes pour la mutation sur le gène *MMACHC*.

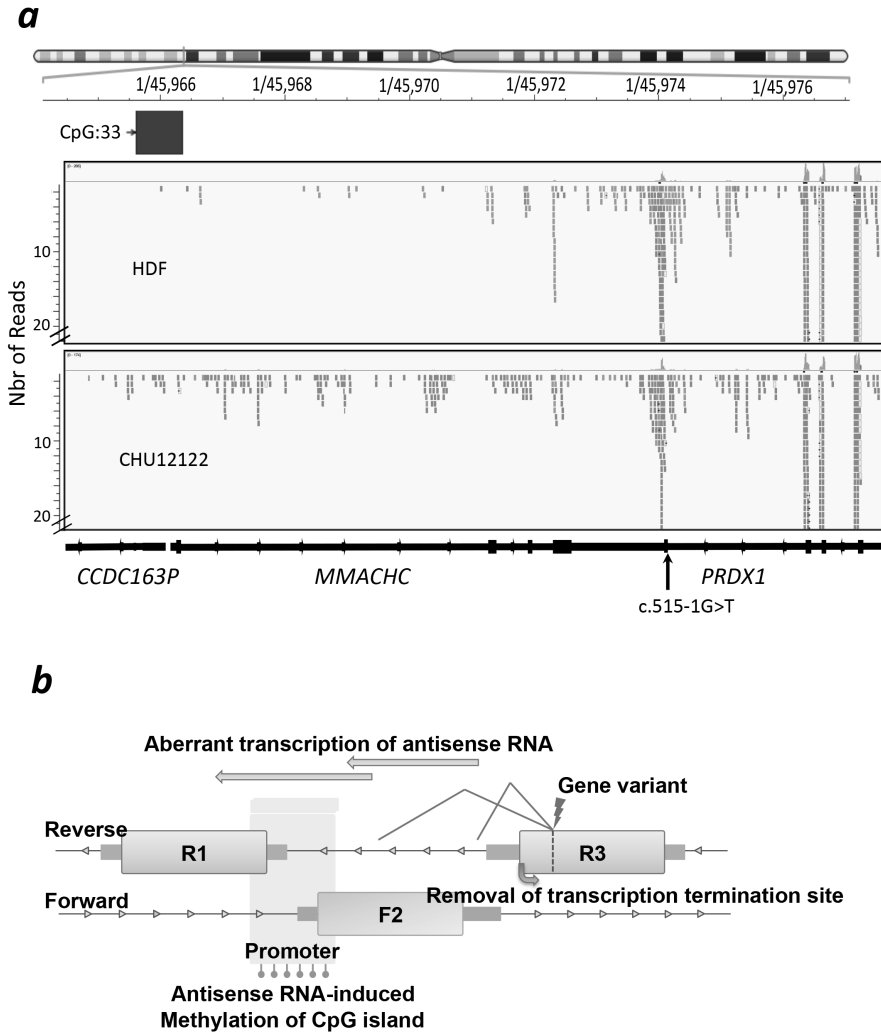


FIG. 4. — Mécanisme moléculaire de production d'une épimutation dans le trio de gènes *CCDC163P-MMACHC-PRDX1*. (a) La mutation *PRDX1* produit une transcription antisens aberrante au travers des gènes *MMACHC* et *CCDC163P* mise en évidence par séquençage à haut débit des ARN des fibroblastes du cas index CHU-12122 et de la lignée témoin HDF. La transcription antisens (en bleu) de *PRDX1* chevauchant *MMACHC* et *CCDC163P* est prédominante dans les fibroblastes CHU-12122 tandis que la transcription sens *MMACHC* (en rouge) est prédominante dans les fibroblastes témoins HDF. (b) Mécanisme d'extinction épigénétique de l'allèle F2 non muté par une mutation sur le gène R3 forçant sa transcription antisens chez des patients porteurs d'une mutation hétérozygote d'un gène causal appartenant à un trio de gènes antisens (R1) — sens (F2) — antisens (R3)

Nous avons reproduit nos résultats dans 5 autres cas recrutés dans 2 centres de Suisse et de France. Nous avons trouvé l'épimutation secondaire et la mutation *c.515-1G>T* de *PRDX1* dans les 5 cas, et confirmé la transmission maternelle de la mutation *PRDX1* avec l'épimutation secondaire dans un cas. Le variant *c.515-1G>T* était présent chez 7 individus d'ascendance européenne sur 66 000 individus déclarés dans la base de données *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, avec une fréquence estimée dans la population générale de 1.05×10^{-4} .

L'épimutation est produite par la transcription antisens du promoteur par prolongement aberrante de celle du gène *PRDX1*

Le gène *MMACHC* appartient à un trio de gènes 1,2,3 lus en sens inverse (reverse, R1) — normal (forward, F2) et inverse (R3) avec des doubles chevauchements partiels de *MMACHC* par *CCDC163P* et *PRDX1* à ses extrémités 5' et 3', respectivement (figure 4). Les 2 mutations rapportées dans *PRDX1* produisent un saut de l'exon 6 et du signal de terminaison de transcription "polyA" de *PRDX1*. Nous avons confirmé par des analyses de séquençage de masse des ARN (RNA-Seq) des fibroblastes que la perte du site de terminaison de la transcription de *PRDX1* produit une extension aberrante de la transcription antisens étendue aux gènes *MMACHC* et *CCDC163P* et à leur promoteur bidirectionnel commun.

La mutation *PRDX1* est responsable de l'extinction de l'expression de *MMACHC* par méthylation de son promoteur. En effet, l'invalidation de la transcription de *PRDX1* par transfection des cellules avec des siRNA restaure l'expression de l'allèle non-muté de *MMACHC* et produit une réversion partielle de l'épimutation.

Les cas « épi-Cbl » représentent le premier exemple d'épimutation secondaire d'une maladie rare, présente dans trois générations et maintenue dans les cellules germinales.

L'extinction génique par méthylation provoquée une transcription antisens à travers l'îlot CpG du promoteur a été précédemment rapporté, notamment pour une alpha-thalassémie liée au gène *HBA2* et des formes familiales de cancer liées au gène *MLH1* [11-12]. Cependant, l'épimutation n'est pas retrouvée dans la descendance et elle est effacée dans le sperme [11-14]. Dans un autre exemple de cancer familial, l'inactivation somatique épigénétique de l'allèle *MSH2* résulte de l'extension de la transcription sens du gène *EPCAM* amont (anciennement *TACSTD1*) produit par les microdélétions en *cis* [15]. De plus les épimutations ont une expression dans les cellules somatique qui est limitée à un seul ou quelques organes, comme c'est par exemple le cas pour les épimutations de *RYR1* impliqués dans une forme de myopathie [16]. La forte expression de *PRDX1* dans les cellules germinales de mammifères peut expliquer pourquoi l'épimutation secondaire échappe à l'effacement dans les spermatozoïdes, contrairement à ces autres maladies [17]. La forte expression de *PRDX1* pourrait également maintenir cette épimutation au cours du développement embryonnaire précoce. En effet, dans un modèle de souris, les gènes ayant des niveaux élevés de H3K36me3 montraient également une méthylation de

l'ADN des cellules germinales [18]. Cette marque des histones est spécifiquement produite par une histone méthyl transférase codée le gène *SETD2* au niveau des gènes qui ont un niveau élevé de transcription par l'ARN polymérase II [19]. Elle favorise le recrutement de *DNMT3B1* responsable de la méthylation *de novo* des îlots CpG dans les cellules souches de souris [20].

Les cas d'*épi-cblC* sont le premier exemple d'une maladie rare produite par hétérozygotie composite épigénétique / génétique dans un gène en position tête bêche dans un trio de gènes

Le gène *MMACHC* appartient à un trio de gènes dans lequel il est flanqué de deux gènes *CCDC163P* et *PRDX1*, qui sont en sens opposé. Ce positionnement joue un rôle central dans la genèse de l'épimutation. Nous pensons que ce mécanisme pourrait aussi se produire dans des maladies rares récessives impliquant un gène R2 dans d'autres trios. Le nombre de trios ayant une configuration similaire au trio *CCDC163P-MMACHC-PRDX1* est limité dans le génome humain [30]. Nous en avons identifié une quarantaine potentiellement en lien avec une transmission récessive de maladies héréditaires du métabolisme [10]. Dans la plupart d'entre eux, l'îlot CpG est hypométhylé, et dans tous les cas, il n'y a pas de transcription antisens du gène adjacent détectée dans les fibroblastes témoins [21, 22]. Nos données suggèrent de rechercher systématiquement la présence d'une épimutation chez les patients ayant une seule mutation hétérozygote et un phénotype sévère pour l'une de ces maladies.

Contrairement aux mutations codantes, les inhibiteurs pharmacologiques des DNMTs tels que la 5-azacytidine pourraient potentiellement effacer partiellement, mais aussi de manière non spécifique, la méthylation d'îlots CpG. Le traitement des fibroblastes provenant de l'un de nos cas d'*épi-cblC* avec la 5-azacytidine a restauré l'expression de *MMACHC* bi-allélique avec détection de l'allèle de type sauvage. Ceci suggère d'évaluer l'utilisation potentielle d'inhibiteurs de DNMT dans le traitement des formes gravissimes et potentiellement mortelles de ces « épi-maladies », comme observé dans nos deux cas pédiatriques.

En conclusion, nous rapportons plusieurs cas d'une maladie métabolique rare causée par une hétérozygotie composite associant une épimutation secondaire et une mutation génétique dans l'autre. Ces cas représentent une entité que nous avons appelée « *épi-cblC* ». L'étude de ces cas ouvre des perspectives sur le diagnostic et le traitement des maladies rares du métabolisme en général et des patients « *épi-cblC* » en particulier. Elle suggère en particulier de rechercher des épimutations dans les maladies rares récessives ayant une présentation sévère typique malgré une mutation à l'état hétérozygote du gène causal.

Liste des abréviations :

Cobalamin, Cbl
5'-déoxyadénosyl-cobalamine, AdoCbl

Desoxythymidine monophosphate, dTM

DNMT, ADN Méthyltransférase

Méthylcobalamine, MeCbl

WES, whole genome sequencing, séquençage du génome entier

Remerciements :

Nous remercions la Région Lorraine et la région du Grand-Est, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), l'Agence nationale française pour la recherche (programme ANR-15-IDEX-04-LUE) de l'i-Site LUE Université d'excellence de l'Université de Lorraine et les Instituts de recherche en santé du Canada pour les subventions institutionnelles, dont le programme GEENAGE, qui ont permis de réaliser cette étude. Nous remercions les parents pour leur précieuse collaboration et les scientifiques de l'Université McGill et Génome Québec et de la Plateforme génomique de l'Institut de Recherche Médicale (Pôle BMS), Université de Lorraine qui ont contribué à l'étude des cas rapportés dans cet article.

RÉFÉRENCES

- [1] Oey H, Whitelaw E. On the meaning of the word 'epimutation'. *Trends Genet.* 2014;30:519-20.
- [2] Horsthemke B. Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;310:45-59.
- [3] Martin DI, Cropley JE, Suter CM. Epigenetics in disease: leader or follower? *Epigenetics.* 2011 ; 6:843-48.
- [4] Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell.* 2014;157:95-109.
- [5] Hitchins MP, Rapkins RW, Kwok CT, Srivastava S, Wong JJ, Khachigian LM *et al.* Dominantly inherited constitutional epigenetic silencing of MLH1 in a cancer-affected family is linked to a single nucleotide variant within the 5'UTR. *Cancer Cell.* 2011;20:200-13.
- [6] Watkins D, Rosenblatt DS. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011;157C:33-44.
- [7] Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D *et al.* Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet.* 2006;38:93-100.
- [8] Lerner-Ellis JP, Anastasio N, Liu J, Coelho D, Suormala T, Stucki M *et al.* Spectrum of mutations in MMACHC, allelic expression, and evidence for genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2009;30:1072-81.
- [9] Green R, Allen LH, Björke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW *et al.* Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17040.
- [10] Guéant JL, Chéry C, Oussalah A, Nadaf J, Coelho D, Josse T *et al.* A PRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nature Communication* 2018; 9:67
- [11] Barbour VM, Tufarelli C, Sharpe JA, Smith ZE, Ayyub H, Heinlein CA *et al.* alpha-thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood.* 2000.96:800-807.

- [12] Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet*;2003 ; 34:157-65.
- [13] Lee HJ, Hore TA, Reik W. Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell.* 2014;14:710-19.
- [14] Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C *et al.* Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science.* 2015;350:aab2006.
- [15] Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M *et al.* Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3'exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009;41:112-17.
- [16] Zhou H, Brockington M, Jungbluth H, Monk D, Stanier P, Sewry CA *et al.* Epigenetic allele silencing unveils recessive RYR1 mutations in core myopathies. *Am J Hum Genet.* 2006 ; 79:859-68.
- [17] Leyens G, Knoops B, Donnay I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 2004;69:243-51.
- [18] Morselli M, Pastor WA, Montanini B, Nee K, Ferrari R, Fu K *et al.* In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. *Elife.* 2015;4:e06205.
- [19] Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V *et al.* Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 2003;23:4207-18.
- [20] Grinchuk OV, Jenjaroenpun P, Orlov YL, Zhou J, Kuznetsov VA. Integrative analysis of the human cis-antisense gene pairs, miRNAs and their transcription regulation patterns. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:534-47.
- [21] Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987; 196:261-82.
- [22] Rhead B, Karolchik D, Kuhn RM, Hinrichs AS, Zweig AS, Fujita PA *et al.* The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:D613-19.

DISCUSSION

M. Jean-Yves LE GALL ?

1) *Quel est le rôle biologique du gène PRDX1 ?*

Ce gène code pour un membre de la famille des peroxirédoxines, des enzymes antioxydantes qui réduisent le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes d'alkyle. La protéine joue un rôle protecteur antioxydant notamment les cellules souches et les cellules germinales. Elle est aussi impliquée dans la progression de certains cancers.

2) *La méthylation présente dans les spermatozoïdes de sujets porteurs d'une mutation de PRDX1 est-elle persistante au cours des différents cycles de déméthylation au cours des premiers stades après la fécondation ?*

Les résultats que nous avons produits ne permettent pas de répondre à cette question de façon certaine. Les données de la littérature suggèrent qu'une partie de l'ADN reste

partiellement méthylé à l'état de traces au cours des premiers stades embryonnaires qui suivent la fécondation, ce qui pourrait permettre à l'ADN méthyltransférase DNMT1 de reméthyliser cet ADN hémi-méthylé. Ces données sont cependant débattues. Certains travaux suggèrent que DNMT1 peut aussi reméthyliser l'ADN qui a été déméthylé et que DNMT3B1 pourrait également le faire pour un nombre plus restreint de gènes. Dans le cas présent, il est possible que le niveau de transcription élevé de *PRDX1* dans les premiers stades de développement de l'embryon permette de maintenir une méthylation résiduelle et de réinscrire l'épimutation. L'hypothèse que l'épimutation soit réinscrite par DNMT3B1 ou DNMT1 indépendamment de la transcription antisens de *PRDX1* n'est pas à écarter mais elle est moins probable.

M. Jean COSTENTIN

*Les agents connus comme donateurs de méthyle : SAM, Methylxanthines.
Peuvent-ils intervenir dans la méthylation de l'ADN ?*

La SAM est le donneur de méthyle universellement reconnu par les ADN méthyltransférases (DNMT) et son rôle est donc central comme substrat dans la genèse d'une épimutation. Les méthylxanthines ne jouent pas ce rôle.

Des mécanismes épigénétiques de méthylation de l'ADN ou de l'acétylation des histones, lequel se transmet le mieux au travers des générations successives ?

Il y a en fait un rôle interdépendants et complémentaires de la méthylation et l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN, ce qui explique que l'on retrouve souvent une transmission des deux types de mécanismes dans les modèles expérimentaux plutôt que la transmission préférentielle de l'un ou de l'autre. Dans le cas présent c'est la transcription anti sens de *PRDX1* qui permet la triméthylation de la lysine 36 de la protéine histone H3 et c'est cette signature H3K36me3 qui permet ensuite le recrutement de DNMT3B1, l'ADN méthyl transférase qui génère l'épimutation sur le gène *MMACHC* causal de la maladie. Il est possible que DNMT3B1 joue un rôle dans le maintien du schéma de méthylation transgénérationnel pour certains gènes, à l'instar de DNMT1. Certains travaux semblent l'indiquer mais cette question reste toujours débattue.

M. Pierre BRISSOT

Les maladies rares au cours desquelles une configuration de gènes « en trio » a été identifiée partagent-elles des caractéristiques d'expression phénotypique ?

Non ces maladies ne présentent pas de caractéristiques phénotypiques communes. Cependant beaucoup d'entre elles sont des maladies rares du métabolisme.