

Hérédité épigénétique chez la souris : implication d'ARN et de microARN

Minoo Rassoulzadegan, Valérie Grandjean, Pierre Gounon et François Cuzin

Unité 636 de l'Inserm et Université de Nice-Sophia Antipolis, 06108 Nice cedex, France
Equipe labellisée Ligue Nationale Française Contre le Cancer

Auteur correspondant : Minoo Rassoulzadegan, minoo@unice.fr

Reçu le 28 Novembre 2007

Résumé – La paramutation est une modification épigénétique héréditaire, découverte chez des plantes et récemment, chez la souris. C'est un changement héréditaire du phénotype associé avec un allèle sauvage à la suite de son passage dans une structure hétérozygote avec un allèle mutant (phénomène quelquefois appelé « conversation interchromosomique »). Souvent il est considéré comme une exception à la base de lois de Mendel, « les allèles sont retrouvés inchangés lors des ségrégations au cours des croisements ». Au contraire la paramutation observée chez la souris résulte d'une modification de l'allèle sauvage du gène *Kit* après transmission à partir d'un hétérozygote avec un allèle mutant « insertion ». Le phénotype des taches blanches visibles aisément par la couleur du pelage est transmis en absence de l'allèle inducteur sur plusieurs générations. Il est corrélé avec une diminution du niveau d'ARNm de *Kit* et une accumulation d'ARN de taille variable de *Kit* dans les spermatozoïdes des souris paramutantes. La micro-injection de l'ARN de l'hétérozygote, ou de l'ARN et des microARN spécifiques de *Kit* dans l'œuf fécondé induit le phénotype « taches blanches ». Le rôle de l'ARN dans l'établissement et le maintien d'un état épigénétique héréditaire est proposé et discuté.

Abstract – Epigenetic heredity in mice: involvement of RNA and miRNAs.

By contrast with a wide definition of the 'epigenetic variation', including all changes in gene expression that do not result from alteration of the gene structure, a more restricted class had been defined, initially in plants, under the name 'paramutation'. It corresponds to epigenetic modifications distinct from the regulatory interactions of the cell differentiation pathways, mitotically stable and sexually transmitted with non-Mendelian patterns. This class of epigenetic changes appeared for some time restricted to the plant world, but examples progressively accumulated of epigenetic inheritance in organisms ranging from mice to humans. Occurrence of paramutation in the mouse and possible mechanisms were then established in the paradigmatic case of a mutant phenotype maintained and hereditarily transmitted by wild type homozygotes. Together with recent findings in plants indicative of a necessary step of RNA amplification in the reference maize paramutation, the mouse studies point to a new role of RNA, as an inducer and hereditary determinant of epigenetic variation. Given the known presence of a wide range of RNAs in human spermatozoa, as well as a number of unexplained cases of familial disease predisposition and transgenerational maintenance, speculations can be extended to possible roles of RNA-mediated inheritance in human biology and pathology.

La paramutation, une variation épigénétique héritable.

La variation épigénétique est une modulation de l'expression de gènes ou de groupes de gènes qui, contrairement à la mutation, n'implique pas de modification de structure (séquence de nucléotides) de l'ADN, et qui néanmoins est transmise de manière stable lors des divisions cellulaires. Elle est jusqu'ici principalement connue pour être maintenue au niveau somatique dans les cellules d'un organisme au cours du développement. Chez les plantes, une classe de variation épigénétique est étudiée sous le nom de « paramutation » (Chandler, 2007; Chandler & Stam, 2004). Elle est caractérisée par sa propriété d'être non seulement stable au cours du développement d'un organisme (niveau somatique) mais d'être transmise à la descendance lors de croisements sur plusieurs générations (niveau germinale) avec des distributions différentes de celles prédites par les lois de Mendel. Aucun phénomène comparable n'avait jusqu'ici été observé chez un animal.

Paramutation chez la souris.

Nous avons identifié chez la souris le premier phénotype sensible à un effet de paramutation, selon ce qui a été décrit par Brink en 1956 chez les plantes. La modification affecte l'expression du gène *Kit*, qui code pour une protéine essentielle dans diverses voies de différenciation en particulier dans la formation des mélanocytes responsables de la coloration des poils (Rassoulzadegan *et al.* 2006). Lorsque, dans le génome, une mutation particulière qui inactive le gène est associée à un gène intact (« allèle sauvage »), la souris (« hétérozygote ») présente des taches blanches caractéristiques. Lors de croisements avec des souris sauvages dont le pelage est uniformément coloré, la majorité de la descendance portant deux allèles sauvages (dont un provient du parent hétérozygote) maintient les zones blanches caractéristiques du mutant. Bien que structurellement normal (séquence de nucléotides inchangée), l'allèle sauvage provenant de l'hétérozygote garde une marque épigénétique qui réduit l'expression du gène. Cette modification est transmise à la descendance au cours de générations successives de croisements entre ces animaux « paramutés » ou avec des partenaires sauvages.

Un nouveau mode de transmission héréditaire.

L'hérédité du caractère paramuté ne suit pas les règles mendéliennes. La découverte fondamentale de Mendel avait été que les allèles d'un locus confrontés dans

un hétérozygote étaient retrouvés non modifiés aux générations suivantes, ce qui n'est clairement pas le cas de l'allèle sauvage paramuté. De ce fait, et au niveau phénotypique, la majorité de la descendance montre la modification. Au niveau du génome cependant, les différents allèles sont distribués comme prévu en génétique classique. Bien que la transmission par la mère ou par le père soit également efficace, l'analyse expérimentale a été plus aisée pour l'hérédité paternelle, le spermatozoïde, d'une structure en apparence relativement simple, étant supposé n'apporter lors de la fécondation que la génome haploïde paternel sous forme compacte. Cherchant quel pouvait être le signal responsable de la transmission de la modification épigénétique, une anomalie de la spermatogenèse des hétérozygotes et de leur descendance paramutée a retenu l'attention. On a en effet observé l'accumulation dans les précurseurs germinaux d'ARNs messagers de *Kit* ainsi que de deux micro ARN spécifiques du gène. Récemment découverts, les micro ARN constituent une classe complexe de molécules de très petite taille (20-22 nucléotides), chacun spécifique d'un gène ou d'un groupe de gènes, dont l'ARN est reconnu par appariement entre séquences complémentaires. Un rôle important leur a été très récemment reconnu dans le contrôle de l'expression des gènes et ceci à différents niveaux, incluant dégradation des ARNs messagers, inhibition de leur traduction et modification de structure de la chromatine.

L'accumulation anormale d'ARN dans les précurseurs germinaux a conduit à examiner les spermatozoïdes des mâles paramutés. Différentes techniques ont montré que ces spermatozoïdes contiennent en quantité significative des molécules d'ARN, le spermatozoïde de la souris normale n'en contenant pas ou très peu. Que la transmission de la variation épigénétique soit due au transfert de ces ARN au cours de la fécondation a été établi par des expériences dans lesquelles des molécules d'ARN définies ont été introduites par microinjection dans des ovocytes fécondés provenant d'un couple normal (embryons au stade une cellule). Après réimplantation dans des mères porteuses, une fraction (50 à 60 %) des embryons ainsi traités produisent des animaux porteurs de la modification (taches blanches caractéristiques) et eux même capables de la transmettre à leur descendance. Les ARNs efficaces incluent les deux microARNs spécifiques du gène *Kit*, d'autres microARNs utilisés comme témoins ne provoquant aucune modification de couleur du pelage.

En résumé :

1. Une variation épigénétique héréditaire est possible chez un mammifère ;

2. Des ARN présents dans la tête du spermatozoïde, incluant des microARN spécifiques de gènes ou de groupes de gènes, en sont les déterminants héréditaires.

Des travaux récents en cours de publication indiquent que la paramutation du gène *Kit* n'est pas un cas isolé. Des phénotypes distincts et complexes ont été observés après microinjection d'autres microARN. De manière intéressante, certains d'entre eux reproduisent des conditions pathologiques connues en clinique humaine, et de plus connues pour être à transmission familiale, pour lesquelles la souris peut apporter des modèles intéressants (Cuzin *et al.*, 2008).

Un rôle de l'ARN dans l'induction de variations épigénétiques a été en parallèle évoqué par des travaux sur l'empreinte génétique (Pauler *et al.*, 2007) et sur la paramutation chez la plante (Alleman *et al.*, 2006). Il est enfin intéressant de rapprocher ces résultats de ceux récemment publiés par un laboratoire américain montrant la présence d'ARN en quantité significative dans le spermatozoïde humain (Ostermeier *et al.*, 2004). Ces données n'avaient toutefois permis que des spéculations sur une fonction possible de ces ARN dans le développement de l'embryon. La souris ici encore nous fournit une piste possible pour l'analyse de l'induction et de la régulation de déterminations épigénétiques.

Références

- Alleman, M., Sidorenko, L., McGinnis, K., Seshadri, V., Dorweiler, J. E., White, J., Sikkink, K. & Chandler, V. L. 2006 An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature*, 442 295-8.
- Brink, R.A. 1956 A Genetic Change Associated with the R Locus in Maize Which Is Directed and Potentially Reversible. *Genetics*, 41 872-89.
- Chandler, V.L. 2007 Paramutation : from maize to mice. *Cell.*, 128 641-5.
- Chandler, V.L. 2004 Chromatin conversations : mechanisms and implications of paramutation. *Nat. Rev. Genet.*, 5 532-44.
- Cuzin, F., Grandjean, V. & Rassoulzadegan, M. 2008 Inherited variation at the epigenetic level : paramutation from the plant to the mouse. *Current Opinion in Genetics & Development* (in press)
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. 2004 Reproductive biology : delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature.*, 429 154.
- Pauler, F., Koerner, M. & Barlow, D. 2007 Silencing by imprinted noncoding RNAs : is transcription the answer ? *Trends Genet.*, 2007, 23 284-92.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I. & Cuzin, 2006 F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature.*, 441 469-74.